

Pferdeklinik der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. med. vet. J. A. Auer)

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. med. vet. B. von Rechenberg
Musculoskeletal Research Unit

**Am Schafmodell reproduziertes Femoroacetabuläres Impingement,
häufigste Ursache der frühen Osteoarthritis beim
nichtdysplastischen Hüftgelenk des Menschen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von
RUTH M-E. FIECHTER

Tierärztin
Dürrenroth (BE)

genehmigt auf Antrag von
PD Dr. med. vet. B. von Rechenberg, Referentin
Prof. Dr. med. Klaus Siebenrock, Korreferent

Zürich 2005

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

1	EINLEITUNG	11
1.1	Problemstellung	11
1.2	Zielsetzung und Hypothese der Arbeit	12
2	LITERATURÜBERSICHT	13
2.1	Das gesunde Hüftgelenk von Mensch und Schaf	13
2.2	Der gesunde Gelenkknorpel	13
2.3	Osteoarthritis	18
2.4	Beurteilung makroskopischer Veränderungen	21
2.5	Beurteilung mikroskopischer Veränderungen	22
2.5.1	Konventionelle Histologie	22
2.5.2	Immunhistochemie	27
2.6	Femoroacetabuläres Impingement als Ursache für Osteoarthritis der Hüfte	29
2.7	Tiermodelle	32
2.8	Das Schaf als Versuchstier	33
3	MATERIAL UND METHODEN	35
3.1	Aufbau der Studie	35
3.2	Verwendete Instrumente	36
3.3	Vorbereitung	38
3.4	Operation	40
3.5	Postoperatives Management	46
3.6	Probengewinnung	48

3.7	Probenaufbereitungs-, untersuchungs- und auswertungsmethoden.....	50
3.7.1	Makroskopische Auswertung deskriptiv / nach Bauer / nach Outerbridge...	50
3.7.2	Konventionelle Histologie	54
3.7.2.1	Probenuntersuchung und -auswertung nach Mankin	55
3.7.2.2	Probenuntersuchung und -auswertung mit van Kossa/McNeal-Färbung	57
3.7.3	Immunhistochemie	57
3.7.3.1	Probenuntersuchung und -auswertung von Kollagen II	57
3.7.3.2	Probenuntersuchung und -auswertung von Kollagen II-Spaltprodukten	58
3.7.4	Auswertung der molekularen Marker bei Osteoarthritis.....	60
3.7.4.1	Quantitative Real-Time PCR	60
3.7.4.1.1	Messenger-RNA Isolierungs-Schritt.....	60
3.7.4.1.2	cDNA Herstellungs-Schritt	62
3.7.4.1.3	Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)	62
3.7.4.2	Enzymatische Bestimmung	65
3.7.4.2.1	Prostaglandin E ₂ -Bestimmung	65
3.7.4.2.2	Stickstoffmonoxid-Bestimmung	65
4	RESULTATE.....	66
4.1	Operation.....	66
4.2	Radiologie.....	66
4.3	Makroskopische Auswertung	67
4.3.1	Deskriptive Auswertung	67
4.3.1.1	Vergleich der Schäden der Acetabulum-Sektoren 7-9 / 12-2 / 4-6	67
4.3.1.2	Vergleich der Schäden Acetabulum-Sektor 7-9 im zeitlichen Verlauf....	74
4.3.1.3	Vergleich der Schäden am Femurkopf und Halsübergang	78
4.3.2	Auswertung der Klassifizierung nach Bauer	80
4.3.3	Auswertung der Gradierung nach Outerbridge	83
4.4	Histologische Auswertung.....	86
4.4.1	Auswertung der Gradierung nach Mankin	86
4.4.2	Auswertung mit van Kossa-/McNeal Tetrachrom-Färbung	94
4.5	Immunhistochemische Auswertung	99
4.5.1	Nachweis von Kollagen Typ II-Überproduktion.....	99

4.5.2	Nachweis von Kollagen II-Spaltprodukten	100
4.6	Biochemische bzw. molekularbiologische Auswertung	105
5	DISKUSSION.....	107
5.1	Versuchsmodell	107
5.2	Probenentnahmemethode	108
5.3	Ergebnisse.....	109
5.3.1	Statistik	109
5.3.2	Radiologie.....	109
5.3.3	Deskriptive Auswertung.....	109
5.3.4	Auswertung der Klassifizierung nach Bauer	110
5.3.5	Auswertung der Gradierung nach Outerbridge	111
5.3.6	Auswertung der Gradierung nach Mankin	112
5.3.7	Auswertung mit van Kossa-/McNeal Tetrachrom-Färbung	113
5.3.8	Molekulare Marker für Osteoarthritis.....	114
5.3.9	Nachweis von Kollagen II-Überproduktion und -Spaltprodukten.....	114
5.4	Zusammenfassung	116
6	SCHLUSSFOLGERUNG.....	119
7	AUSBLICK.....	120
8	LITERATURVERZEICHNIS	121
9	ANHANG	125
10	DANKSAGUNG.....	131

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure /-acid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CS	Chondroitinsulfat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure /-acid
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosidtriphosphat
FAI	Femoroacetabulare Impingement
FAM	6-Carboxyfluorescein
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
iNOS	induzierbare Nitroxid-Synthase
i.v.	intravenös
KS	Keratansulfat
LPS	Lipopolysaccharide
MG	Mankin-Grad
MMP	Matrix-Metalloprotease
MR	Magnetic Resonance
mRNA	messenger Ribonukleinsäure /-acid
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid / Nitroxid
OA	Osteoarthritis
PBS	Phosphate Buffer Solution
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
p.o.	per os
RPM	Umdrehungen pro Minute / Rounds per minute
RNA	Ribonukleinsäure /-acid
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Real-time Polymerase-Ketten-Reaktion / Chain Reaction
s.c.	subcutan

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aggrecan-Hyaluron-Aggregat.....	15
Abbildung 2: Aufbau des Gelenkknorpels.....	17
Abbildung 3: Pathogenese der Osteoarthritis vereinfacht dargestellt.....	20
Abbildung 4: Histologische Kriterien nach Mankin.....	24
Abbildung 5: Fortsetzung Histologische Kriterien nach Mankin.....	25
Abbildung 6: Unmineralisiertes Osteoid.....	26
Abbildung 7: Spaltstelle der Kollagen II-Tripelhelix durch Kollagenasen.....	28
Abbildung 8: Vergleich Femurkopf-Formen.....	34
Abbildung 9: Stellung der Hüfte bei Mensch und Schaf.....	34
Abbildung 10: Kleintier-Instrumentarium für Varisationsosteotomie.....	37
Abbildung 11: Operationstechnik.....	43
Abbildung 12: Varisationsosteotomie [Schritt 1 - 4].....	44
Abbildung 13: Fortsetzung Varisationsosteotomie [Schritt 5-8].....	45
Abbildung 14: Hängesystem.....	47
Abbildung 15: Sektoren am Acetabulum.....	49
Abbildung 16: Schnittlinie am Femurkopf.....	49
Abbildung 17: Klassifizierung nach Bauer.....	52
Abbildung 18: Makroskopisch sichtbare Labrumveränderungen.....	72
Abbildung 19: Makroskopisch sichtbare Veränderungen Übergang Labrum/Knorpel.....	73
Abbildung 20: Makroskopisch sichtbare Veränderungen Femurkopf + Halsübergang	79
Abbildung 21: Vergleich der subchondralen Knochenplatte.....	98
Abbildung 22: Immunhistochemischer Vergleich Kollagen II-Spaltprodukte.....	101
Abbildung 23: Gesunder Knorpel aus Tibiaplateau als Vergleich.....	103
Abbildung 24: Vergleich Impingement-Stellen bei Mensch und Schaf.....	108
Abbildung 25: Stellen der Hauptschäden am Acetabulum.....	118

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Versuchstieraufstellung	35
Tabelle 2: Gradierung nach Outerbridge	53
Tabelle 3: Histologisch-Histochemisches Grading nach H.J. Mankin.....	56
Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden	64
Tabelle 5: Deskriptive Auswertung Labrumveränderungen	68
Tabelle 6: Deskriptive Auswertung Veränderungen Übergang Knorpel/Labrum	69
Tabelle 7: Deskriptive Auswertung Knorpelveränderungen.....	71
Tabelle 8: Deskriptive Auswertung Veränderungen Femurkopf	78
Tabelle 9: Deskriptive Auswertung Veränderungen Femurkopf/-halsübergang	78
Tabelle 10: Auswertung der Veränderungen nach Bauer.....	81
Tabelle 11: Auswertung der Veränderungen nach Outerbridge	83
Tabelle 12: Auswertung nach Mankin, operierte Seite versus Kontrollseite	86
Tabelle 13: Vergleich Mankin-Grade nach Zonen	89
Tabelle 14: Vergleich der subchondralen Reaktion operierte Seite / Kontrollseite	94
Tabelle 15: Vergleich der subchondralen Knochenreaktionen nach Zonen	96
Tabelle 16: Vergleich der OA-Marker operierte Seite versus Kontrollseite.....	106

DIAGRAMMVERZEICHNIS

Diagramm 1: Graph. Darstellung deskriptive Auswertung Labrumveränderungen....	68
Diagramm 2: Graph. Darstellung deskriptive Auswertung Übergang Knorpel/Labrum	69
Diagramm 3: Graph. Darstellung deskriptive Auswertung Knorpelveränderungen....	71
Diagramm 4: Deskriptive Auswertung Labrumveränderungen nach Zeit	75
Diagramm 5: Deskriptive Auswertung Übergang Labrum/Knorpel nach Zeit.....	76
Diagramm 6: Deskriptive Auswertung Knorpelveränderungen nach Zeit	77
Diagramm 7: Boxplot der Auswertung nach Outerbridge	84
Diagramm 8: Boxplot der Auswertung nach Mankin, Acetabulum.....	87
Diagramm 9: Boxplot der Auswertung nach Mankin, Femurkopf.....	88
Diagramm 10: Boxplot der Mankin-Grade nach Zonen, Acetabulum	90
Diagramm 11: Vergleich der Mankin-Grade nach Zeit, Acetabulum	91
Diagramm 12: Boxplot der Auswertung mit van Kossa/McNeal-Färbung.....	95
Diagramm 13: Vergleich der subchondralen Knochenreaktionen nach Zeit.....	97
Diagramm 14: Nachweis von Kollagen II-Überproduktion	99

TERMINOLOGIE

Lage am Körper	Mensch	Schaf
oben	cranial/superior	dorsal
unten	caudal/inferior	ventral
vorne	ventral/anterior	cranial
hinten	dorsal/posterior	caudal

ZUSAMMENFASSUNG

Das Femoroacetabuläre Impingement (FAI) ist ein vor kurzem postulierter Pathomechanismus, der einen Anschlag-Konflikt zwischen Acetabulumrand und proximalem Femur beschreibt. Wir schlagen einen asphärischen Femurkopf als möglicher Grund für FAI vor, was zu früher Osteoarthritis beim nichtdysplastischen menschlichen Hüftgelenk führt. Diese, meist jungen, sportlichen Patienten leiden nach langem Sitzen oder bei endgradiger Flexion / Innenrotation des Hüftgelenks an Inguinalschmerzen. Das Ziel dieser Studie war, Läsionen zu reproduzieren, welche jenen des Menschen vergleichbar sind sowie den Pathomechanismus mit einem Tiermodell zu bestätigen. Dafür wurde das Schaf wegen den dem Menschen vergleichbaren anatomischen Verhältnissen bzw. dem asphärischen Femurkopf gewählt. Es wurden 16 Schafe eingesetzt, die nach 14, 22, 30, 38 Wochen geschlachtet wurden. Um FAI zu provozieren wurde mit einer intertrochantären Varisationsosteotomie der unrunde Femurkopfteil ins Acetabulum gegen die Hauptbelastungszone verlagert. Aus standardisierten Gelenksegmenten wurden Knorpel, Labrum und subchondraler Knochen makroskopisch, histologisch, immunhistochemisch und mikrobiologisch untersucht. Die nichtoperierte Hüfte diente als Kontrolle. Die typischen Labrum- und Knorpelveränderungen konnten an den erwarteten Stellen gefunden werden und waren vergleichbar mit jenen des Menschen. Die Schäden auf der operierten Seite waren statistisch signifikant höher als jene der nichtoperierten Seite. Der Pathomechanismus, bei dem ein asphärischer Femurkopf zu Osteoarthritis führt, konnte bestätigt werden. Das Schaf als Versuchstier hat sich für diese Arbeit bewährt.

SUMMARY

Femoroacetabular impingement, a common cause of osteoarthritis in nondysplastic hips in people was reproduced in sheep.

Femoroacetabular impingement (FAI) is a new postulated etiology for osteoarthritis that represents an abutment conflict between the acetabular rim and the proximal femur. We propose a non-spherical femoral head, as a possible cause for femoroacetabular impingement, which leads to early osteoarthritis of nondysplastic hips in people. These patients, mostly young active adults, complain of pain in the inguinal region after longer sitting or in abrupt flexion and internal rotation of the hip joint. The aim of this research study was to reproduce this condition in an animal model to help elucidate and confirm the proposed pathologic mechanism. Sheep have been chosen because of the anatomical similarities of the coxofemoral joint. The main functional similarity includes a non-spherical portion at the femoral head. Sixteen sheep were divided into 4 groups. After creating an intertrochanteric adduction osteotomy, the non-spherical part of the femoral head was rotated into the acetabulum toward the weightbearing zone to trigger FAI. The sheep were sacrificed after 14, 22, 30, 38 weeks. In standardized sections, the cartilage, labrum and subchondral bone were examined and alterations evaluated macroscopically, histologically, and by immunohistochemical and microbiological techniques. The contralateral non-operated limb was used as a control. Cartilage alterations were detected in the expected sites and the damage at the labrum and adjacent cartilage were comparable to those of humans. The pathologic changes noted on operated limbs were statistically significantly greater than control limbs. From this study it was determined that a non-spherical femoral head resulted in the development of osteoarthritis and using sheep proved to be a suitable animal model.

1 EINLEITUNG

1.1 Problemstellung

Ein unrunder (asphärischer) Femurkopf kann schon bei jungen Menschen zu einer frühen Osteoarthritis am Hüftgelenk führen und gilt daher als Präarthrose, ohne dass es für lange Zeit eine befriedigende Erklärung für den zugrunde liegenden Pathomechanismus gab. Die mehrheitlich anerkannte Theorie über die Ursache der Hüftosteoarthritis, basierend auf erhöhter axialer Belastung der Gelenkpfanne in der Hauptbelastungszone, wie sie bei Hüft dysplasie vorkommt, stellt für den asphärischen Hüftkopf keine befriedigende Erklärung dar [1]. Frühe Hüftbeschwerden bei Patienten mit einem asphärischen Hüftkopf treten typischerweise besonders nach sportlicher oder körperlicher Betätigung auf. Die Beschwerden können bei der Untersuchung durch endgradige Beugung und Innenrotation ausgelöst werden [2-5]. Der asphärische Kopf kann mit Röntgenaufnahmen und die Knorpelläsionen können mit Magnetresonanz- (MR) Untersuchungen eindeutig sichtbar gemacht werden [2, 4, 6, 7]. Bei operativer Eröffnung des Hüftgelenks finden sich typische, umschriebene Knorpelschäden. Besonders ausgeprägte Veränderungen zeigen sich cranioventral am Femurkopf, wo sich der asphärische Kopfanteil zungenähnlich in Richtung Trochanter major ausdehnt [5, 8]. Zudem sind Labrumrisse und Knorpelschäden in einem eingrenzba ren vorderen Segment des Acetabulums anzutreffen. Als möglicher, mechanischer Grund für diese Läsionen wird der seit kurzem beschriebene „Femoroacetabular Impingement“-Mechanismus vorgeschlagen. Bei diesem Pathomechanismus kommt es in maximaler Flexion und Innenrotation zu einem Anstossen des asphärischen Femurkopf/-Halsteils an den vorderen Acetabulumrand mit Einklemmen („Impingement“) des dazwischen liegenden Labrums. Bei diesem sich häufig wiederholenden Pathomechanismus entstehen typischerweise Labrum- und Knorpelveränderungen an den erwähnten Stellen. Diese Veränderungen führen dann zu der beschriebenen klinischen Symptomatik. Es wird postuliert, dass sich diese lokalen Veränderungen zu einem generalisierten Hüftgelenksschaden im Sinne des Vollbildes einer Osteoarthritis ausbreiten.

1.2 Zielsetzung und Hypothese der Arbeit

Ziel der Untersuchung war es, ein Tiermodell im Schaf zu etablieren und anhand der Veränderungen am Hüftgelenk den Beweis für den „Femoroacetabular-Impingement“-Mechanismus und dessen Ursachen zu erbringen. Zudem sollten die im zeitlichen Krankheitsverlauf unterschiedlichen Veränderungen der genauen Klärung des Pathomechanismus dienen und Aufschluss über die Pathogenese der generalisierten Osteoarthritis erbringen. Es sollten somit beim Schaf Knorpelveränderungen erzeugt werden, die mit jenen des Menschen vergleichbar sind. Es wurde erwartet, dass die erhaltenen Resultate zu weiteren Studien über die Prophylaxe bzw. Therapie dieser pathologischen Befunde führen könnten.

Die Studie basiert auf der Hypothese, dass in Schafen dieser Mechanismus durch eine Veränderung des Femurhalswinkels künstlich hervorgerufen werden kann.

Das gesunde Schaf besitzt an der Portio dorsalis am Femurkopf einen asphärischen Knorpelanteil, welcher dem des morphologisch veränderten, asphärischen Femurkopf des Menschen ähnelt, womit sich diese Tierart besonders gut für diesen Versuch eignet. Um die gleichen statischen und dynamischen Bedingungen beim Schaf wie beim Menschen zu schaffen, wurde eine Varisations-Osteotomie des Femurs, direkt unter dem Trochanter minor, vorgenommen. Dadurch wurde der asphärische Teil des Femurkopfes durch lateromediale Rotation in Richtung der Gelenkmitte gedreht, was bei endgradiger Flexion zu einem Impingementkonflikt des asphärischen Kopfteils mit dem dorsocaudalen Pfannenrand führen soll. Nach einer Laufzeit von mehreren Monaten sollten sich durch diese Varisation frühe degenerative

Knorpelveränderungen ergeben. Um den Grad der Degeneration untersuchen und evaluieren zu können, wurden makroskopisch sichtbare Veränderungen fotografisch und zeichnerisch festgehalten, verglichen und nach etablierten Kriterien eingeteilt.

Von Femurkopf und Acetabulum wurden aus standardisierten Gelenk-Sektoren, d.h. an Stellen, der zu erwartenden Veränderungen, histologische Schnitte angefertigt und nach den Mankin-Kriterien [9] erfasst und gradiert. Die Alterationen des Proteoglykan- und Kollagenanteils wurden mit histologischen bzw. immunhistochemischen Methoden nachgewiesen und die Konzentrationen der lokalen Mediatoren und Enzyme wurden auf biochemischem bzw. molekularbiologischem Niveau dargelegt.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Das gesunde Hüftgelenk von Mensch und Schaf

Das Hüftgelenk ist ein Kugelgelenk. Es ist aus dem Acetabulum und dem Capitis ossis femoris zusammengesetzt und besitzt eine umschliessende Gelenkkapsel, die mit Synovia gefüllt ist. Zwischen den beiden Gelenkanteilen bleibt ein schmaler Spalt, der überall etwa gleich breit ist. Das Acetabulum besitzt eine halbkugelförmige Vertiefung, die mit einer hufeisenförmigen Knorpelschicht ausgekleidet ist [10]. Das Labrum acetabulare vertieft die Acetabulumhöhle und umschliesst in optimaler Passform und Überdachung den Femurkopf [4]. Über das Ligamentum capitis ossis femoris ist das Acetabulum mit dem Caput ossis femoris verbunden. Die normomorphologische Kontur des menschlichen Femurkopfes ist nahezu kugelförmig, der Femurkopf des Schafes ist ellipsoid geformt.

2.2 Der gesunde Gelenkknorpel

Diarthrotische Gelenke besitzen an den artikulierenden Knochenenden eine dünne Schicht von kortikalem Knochen, subchondrale Knochenplatte genannt, die mit Gelenkknorpel überzogen ist. Der Gelenkknorpel besitzt eine porzellanweisse Farbe, ist glattglänzend und besteht aus hyalinem Knorpel. Er dient der reibungsarmen Bewegung, besitzt stossdämpfende Eigenschaften und wirkt zudem Zug- und Scherkräften entgegen. Unter Druck deformiert sich der Knorpel, nimmt aber nach Entlastung die Ausgangsform wieder an.

Die Knorpelmasse besteht zu 95 % aus extrazellulärer Matrix und wenigen teilungsfähigen Chondroblasten [11, 12].

Die Knorpelmatrix ist aus drei Hauptbestandteilen zusammengesetzt:

- 1) **Proteoglykane**, hauptsächlich Aggrecane, riesige Makromoleküle, die mit Hyaluronsäure aggregieren. In den oberen Knorpelschichten befinden sich wenig Aggrecane, der Gehalt steigt aber mit zunehmender Tiefe [13]. Sie bestehen aus einem linearen Kernprotein und vielen unverzweigten Polysaccharid-Seitenketten, den längeren Chondroitinsulfaten und den kürzeren Keratansulfaten (siehe Abb. 1). Diese Sulfate werden Glykosaminglykane genannt. Sie besitzen eine hohe Dichte an negativen Ladungen und ziehen grosse Mengen osmotisch aktiver Kationen an. Dies führt zu einer hohen Wasserbindungskapazität. Dadurch entsteht ein Quelldruck, der äusseren Druckkräften widersteht [13-15].

- 2) **Ein kollagenes, trajektoriell ausgerichtetes Netzwerk**, das vorwiegend aus Kollagen Typ II besteht. Die Kollagenfasern sind bogenförmig angeordnet. Sie stehen senkrecht auf dem subchondralen Knochen und nehmen unter der Knorpeloberfläche einen tangentialen Verlauf ein (siehe Abb. 2).
Ungefähr 5 - 10 % entfallen auf andere Typen, auf die hier nicht weiter eingegangen wird. Aus den Chondroblasten werden Prokollagen-Moleküle mit einem carboxyl- (C) und einem amino- (N) Ende entlassen. Sie sind aus drei identischen, helikalen α -Ketten zusammengesetzt. Diese Prokollagene besitzen an beiden Enden nichthelikale Propeptide, welche erst im extrazellulären Raum enzymatisch abgespalten werden [13]. Die entstandenen Kollagen-Moleküle bilden in Selbstmontage Kollagen-Fibrillen. Die Kollagenfaser ist ein Polymerprotein-Produkt, das aus vielen Kollagen-Fibrillen zusammengesetzt ist. Kollagenfibrillen sind zur Organisation und Stabilisierung durch verschiedene intermolekulare Querverbindungen, wie fibrillen-assoziierte Kollagene, miteinander vernetzt und bilden ein Endoskeleton der extrazellulären Masse, das eine hohe Zugfestigkeit besitzt [14] und zusammen mit den im Kollagennetz gefangenen Proteoglykanen übermässigem Quelldruck entgegenhält [13].

- 3) **Extrazelluläres Wasser**, das im Austausch mit der Synovia steht.

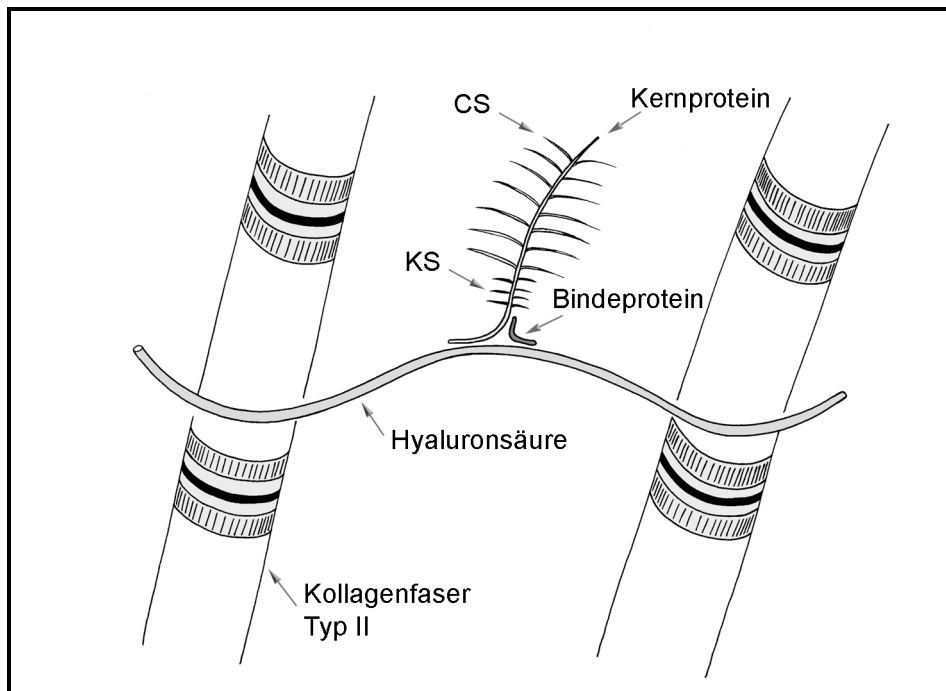


Abbildung 1: Aggrecan-Hyaluron-Aggregat¹

In der Knorpelmatrix befinden sich entlang den arkadenförmig angeordneten Kollagenfasern die Chondrozyten. Obschon die Chondrozyten nur einen sehr geringen prozentualen Anteil der Knorpelmasse ausmachen, sind sie für die Synthese vieler proteolytischer Enzyme verantwortlich und bilden zudem die extrazelluläre Matrix. Physiologischerweise unterliegt die extrazelluläre Matrix einem aktiven, perizellulären Turnover, der auch eine gewisse Proteolyse beinhaltet, die durch Matrix-Metalloproteasen vermittelt wird [16].

¹ CS = Chondroitinsulfat, KS = Keratansulfat

Der gesunde Gelenkknorpel ist klar strukturiert aufgebaut und kann in histomorphologisch differenzierbare Schichten eingeteilt werden [17]

(siehe Abb. 2):

- 1) Die Tangentialschicht mit ellipsoiden Zellen, deren Längsachse parallel zu den tangential verlaufenden Kollagenfasern liegt. Diese Schicht zeichnet sich durch einen geringen Proteoglykan- und hohen Kollagengehalt aus [18].
- 2) Die Übergangsschicht, in welcher die Kollagenfasern von der radiären in die tangential Richtung übergehen. In dieser Schicht ist die Proteoglykandichte am höchsten [18].
- 3) Die Radiärschicht mit runden, synthesefähigen Zellen, die sich säulenartig entlang den senkrechten Kollagenfasern anordnen.

Die Tidemark, eine mikroskopisch deutlich sichtbare dunkle Grenzlinie, trennt die obere, unmineralisierte Knorpelschicht scharf vom darunter liegenden mineralisierten Knorpel. Der mineralisierte Knorpel liegt direkt auf dem subchondralen Knochen. Die Kollagenfasern der Radiärschicht setzen sich in der Tidemark fort und bilden den Übergang vom unmineralisierten in den mineralisierten Knorpel. Obschon die Kollagenfasern nicht in den subchondralen Knochen reichen, bleibt der Knorpel wegen der interdigitierenden Kontaktfläche in seiner Position (siehe Abb. 2).

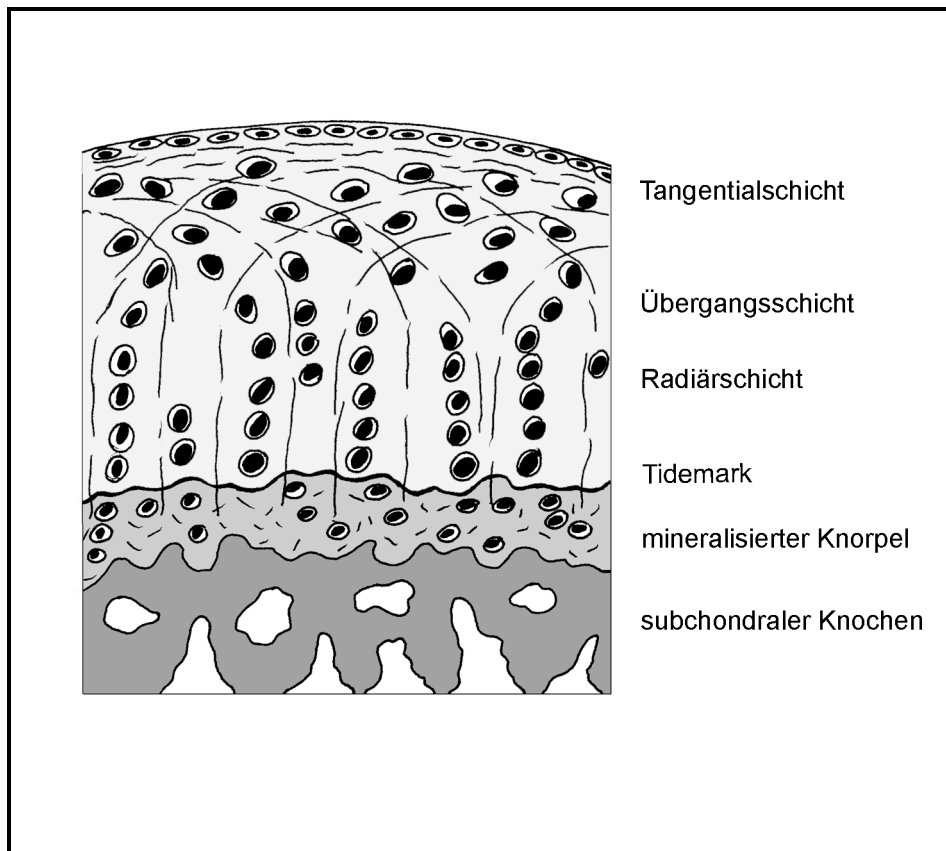


Abbildung 2: Aufbau des Gelenkknorpels

2.3 Osteoarthritis

In der Nomenklatur sind für diese degenerative Gelenkerkrankung die Bezeichnungen Arthropathia deformans, Arthrosis deformans, Osteoarthrose oder Osteoarthritis gebräuchlich. Da es im fortgeschrittenen Erkrankungsverlauf der Gelenke meist zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Entzündungsmediatoren kommt, hat sich der Begriff Osteoarthritis im englischen Sprachraum durchgesetzt und wurde seither in den meisten modernen deutschsprachigen Veröffentlichungen übernommen.

Die Osteoarthritis (OA) ist eine primär nicht entzündliche, degenerative, chronisch progressive Erkrankung der beweglichen Gelenke. Dem Beginn der Osteoarthritis können verschiedene Ursachen, wie angeborene und erworbene Fehlstatik des Bewegungsapparates sowie Überbelastung infolge Übergewicht oder übermässiger sportlicher Betätigung zugrunde liegen. Diese Faktoren beeinflussen die Artikulation, und es kommt zu mechanisch bedingten Veränderungen sowohl in Struktur und Form der Gelenkflächen, der Gelenkkapsel und der Synovialis als auch im subchondralen Knochen [18]. Die Pathogenese ist ein sich selbst erhaltender und beschleunigender Mechanismus, bei dem der Matrixanabolismus und -katabolismus im Ungleichgewicht steht, und die Degeneration des Gelenkknorpels die Hupterscheinung darstellt.

Anfänglich sind makroskopisch nur Gelbverfärbungen und eine raue Oberfläche des Gelenkknorpels zu sehen. Im späteren Verlauf entstehen Fibrillationen oder gar Fissuren, die bis auf den subchondralen Knochen reichen können. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zur Nekrose der Knorpelzellen. Als Ersatzgewebe wird minderwertiger, fibrotischer Faserknorpel gebildet. Im Endstadium der OA entsteht eine „Knorpelglatze“, d.h. es liegt der nackte subchondrale Knochen vor [19].

Auf zellulärer und molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass die Chondrozyten mit der Ausschüttung von Interleukinen auf die Fehlbelastung reagieren.

Interleukine-1 sind als wichtige Trigger für den Knorpelniedergang bekannt [20]. Sie fördern die Bildung und Aktivierung knorpeldegradierender Enzyme, wie Matrix-Metalloproteasen, die im gesunden Gelenk inaktiv vorliegen [21-23]. Initial werden Glykosaminglykane durch Stromelysine (MMP-3/MMP-10/MMP-11) angegriffen [24, 25], sie verlieren ihr Wasserbindungsvermögen und damit auch ihre stossdämpfende Eigenschaft. Der Verlust beginnt in den oberen Schichten und setzt sich, falls die schädigenden Umstände nicht rasch behoben werden, in der Tiefe fort.

Die Chondrozyten sind dadurch ebenfalls schädigenden Kräften ausgesetzt, bilden als Kompensationsversuch vermehrt Kollagenfasern [26, 27], proliferieren, mauern sich selbst in Zellnestern, Clusters genannt, ein und sterben schliesslich ab.

Die Kollagenfasern, ihrer stützenden Umgebung beraubt, fasn sich auf, werden fragil und angreifbar gegenüber Enzymen, namentlich die Kollagenasen (MMP-1/MMP-13) [28] und Gelatinasen (MMP-2/MMP-9). Dadurch verlieren die Fasern ihre Zugfestigkeit und die Eigenschaft, dem Quelldruck entgegenzuhalten. Der Knorpel schwillt an, wird weich und kann reißen [15].

Des Weiteren beeinflusst IL-1 die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) [21]. Diese beiden Stoffe gehören zu den wichtigsten lokalen Entzündungsmediatoren im Stoffwechsel des Gelenkknorpels und verändern ihre Konzentration bei Osteoarthritis [29, 30].

PGE₂ ist ein Eikosanoid, es leitet sich von Membranphospholipiden ab, die durch die Phospholipase A₂ in Arachidonsäuren überführt werden. Das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) katalysiert die Arachidonsäuren zu Prostaglandinen [31]. Es sind keine Antagonisten für Prostaglandine bekannt. Die Hemmung erfolgt indirekt, indem die Synthese-Enzyme Phospholipase A₂ und COX-2 vermindert gebildet werden.

NO ist ein Gas und diffundiert schnell durch Zellmembranen. Es wirkt als Signalmolekül bei vielen physiologischen Prozessen. Seine kurze Halbwertszeit als freies Radikal ermöglicht daher nur eine lokale Wirkung. Deshalb wird angenommen, dass NO auch intraartikulär generiert wird. Über das Redox-Potential aktiviert NO Proteinasen, Kinasen und regulatorische Proteine. In einer Reaktion, welche die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) katalysiert, wird Arginin zu NO und Citrullin umgewandelt [32]. Es sind drei Isoformen von Nitrit-Oxid-Synthasen bekannt. Die für

diese Arbeit interessante Isoform ist die induzierbare Nitrit-Oxid-Synthase, kurz iNOS genannt [32].

Die molekularen Zusammenhänge sind in der untenstehenden Abbildung 3 ersichtlich (mit freundlicher Genehmigung von B. von Rechenberg aus ihrer Habilitationsschrift „Subchondral cystic lesions in horses“ [33] übernommen und leicht modifiziert).

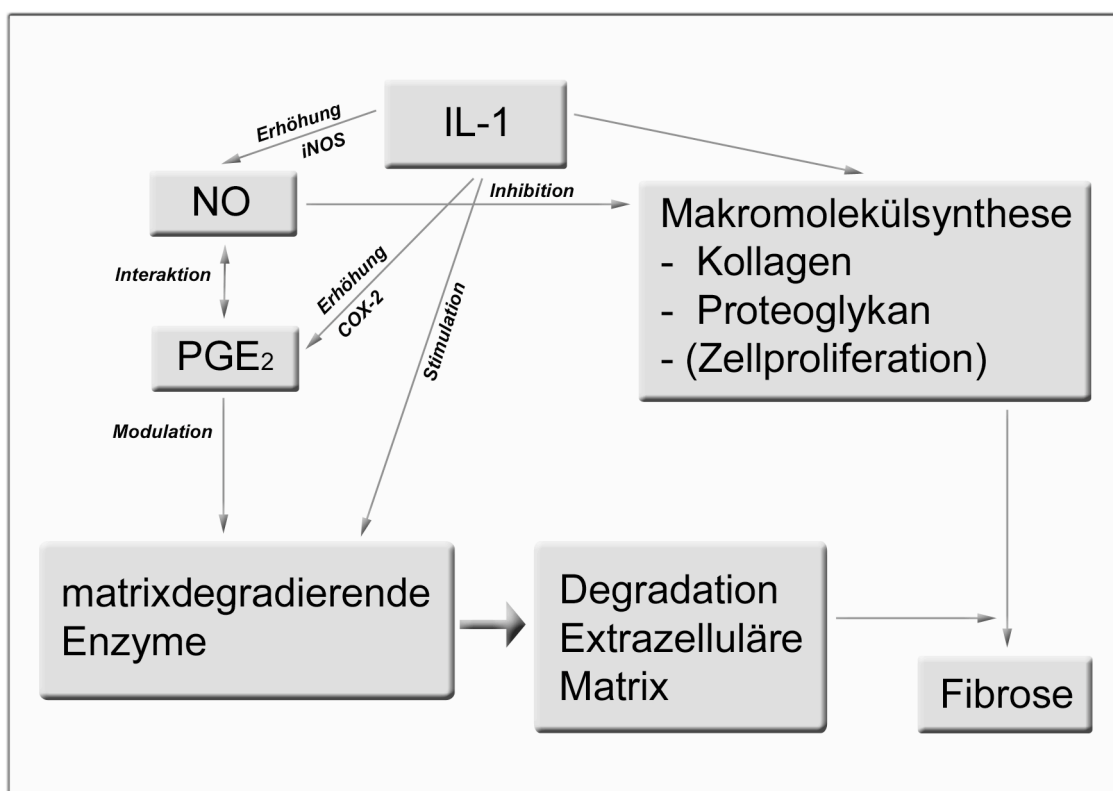


Abbildung 3: Pathogenese der Osteoarthritis vereinfacht dargestellt

2.4 Beurteilung makroskopischer Veränderungen

Die entstandenen Knorpelveränderungen können bereits auf makroskopischer Ebene beschreibend und auch gemäss etablierten Klassifikationssystemen beurteilt werden.

Mats Bauer hat in einer Studie 140 Kniegelenke bei erwachsenen Menschen arthroskopisch analysiert und die erfassten Knorpelschäden nach einer von ihm erstellten Einteilung klassifiziert. Dabei hat er versucht, die den Läsionen zugrunde liegenden Kräfte zu zuordnen. Die Knorpelveränderungen wurden in sechs Typen eingeteilt und wie folgt beschrieben [34]:

- Typ I) linearer Riss, vorwiegend aus Scherkräften resultierend
- Typ II) sternförmiger Riss, tritt nach Schlägen und Rotationskräften auf
- Typ III) Flap oder Lappen, durch Einklemmung der Gelenkstrukturen entstanden
- Typ IV) Krater, meist durch Scherkräfte entstanden
- Typ V) Fibrillation, repräsentiert frühe Phase der degenerativen Arthrose
- Typ VI) Degeneration, lokalisierte Arthrose in der gewichttragenden Zone

Die Reihenfolge der aufgezählten Typen entspricht nicht unbedingt einem aufsteigenden Schweregrad. In einem Gelenk können verschiedene Typen nebeneinander vorkommen.

Eine andere von Outerbridge in den 60er Jahren erstellte Gradierung wurde ursprünglich für die Bewertung der Chondromalacia patellae erstellt [35]. Im Laufe der Zeit hat sich dieses System jedoch in der Orthopädie etabliert und wurde für Knorpelveränderungen anderer Gelenke extrapoliert [36]. Er schlug vier aufsteigende Schweregrade vor.

- Grad 1 - weicher, geschwollener Knorpel
- Grad 2 - Fragmentierung und Fissurierung (halber Durchmesser)
- Grad 3 - Fragmentierung und Fissurierung (ganzer Durchmesser)
- Grad 4 - Erosion bis auf den Knochen

2.5 Beurteilung mikroskopischer Veränderungen

2.5.1 Konventionelle Histologie

Auf histologischem Niveau können die Veränderungen nach verschiedenen Kriterien evaluiert werden. Anfang der siebziger Jahre untersuchte Mankin den osteoarthritischen Knorpel auf biochemische und metabolische Abnormalitäten und versuchte eine Korrelation zu dem von ihm entwickelten „Histological-Histochemical Grading“ zu finden, was nicht vollumfänglich gelang. Trotzdem hat sich sein Gradierungssystem (siehe Tab. 3) in der Praxis bewährt, da eine gute Übereinstimmung zwischen der Höhe des Mankin-Grades (Grad 1 bis 14) zur Schwere der Erkrankung besteht. Zudem ging aus seiner Studie hervor, dass von der Norm abweichende Proteoglykan-Verteilungsmuster Veränderungen im Knorpelaufbau hervorrufen [9, 27].

Mit unterschiedlichen histochemischen Färbemethoden können Kollagene, Proteoglykane und Glykosaminglykane, mineralisierter und unmineralisierter Knochen farblich visualisiert und lokalisiert werden.

Die **Toluidin-Blau O-Färbemethode** beruht auf der selektiven Bindung des Farbstoffes an die Chondroitinsulfate. Chondroitinsulfate sind polyanionisch und binden daher basophile, metachromatische Farbstoffe. Die gebildeten Komplexe ändern ihr Farbspektrum. Dieser chemische Vorgang wird Metachromasie genannt. Die verfügbaren Bindestellen widerspiegeln die enge Korrelation zwischen der Dichte der Färbung und dem in der Knorpelmatrix vorhandenen Proteoglykan-Gehalt [37]. Wie im Kapitel „Osteoarthritis“ beschrieben, gehen die Proteoglykane schon im frühen Krankheitsverlauf verloren. Der Verlust beginnt in der oberen Knorpelschicht und kann im späteren Verlauf über die ganze Knorpeldicke nachgewiesen werden [38]. Die neu gebildeten Proteoglykane sind länger als diejenigen im normalen Gelenkknorpel. Sie verfügen über weniger Glykosaminglykane und somit über eine kleinere Anzahl Bindungsstellen [12], was in der Toluidin-Blau O-Färbemethode als Entfärbung sichtbar wird. In der histologischen Auswertung ist dies ein wichtiges Kriterium für die Schwere der OA. Mit dieser Färbung werden ebenfalls sämtliche

anderen Strukturen, die nach Mankin-Kriterien beurteilt werden, visualisiert und auswertbar gemacht, wie:

- Pannus
- Risse
- Hyperzellularität
- Clusters
- Hypozellularität
- durchbrochene Tidemark

Bildbeispiele siehe in den Abbildungen 4 + 5

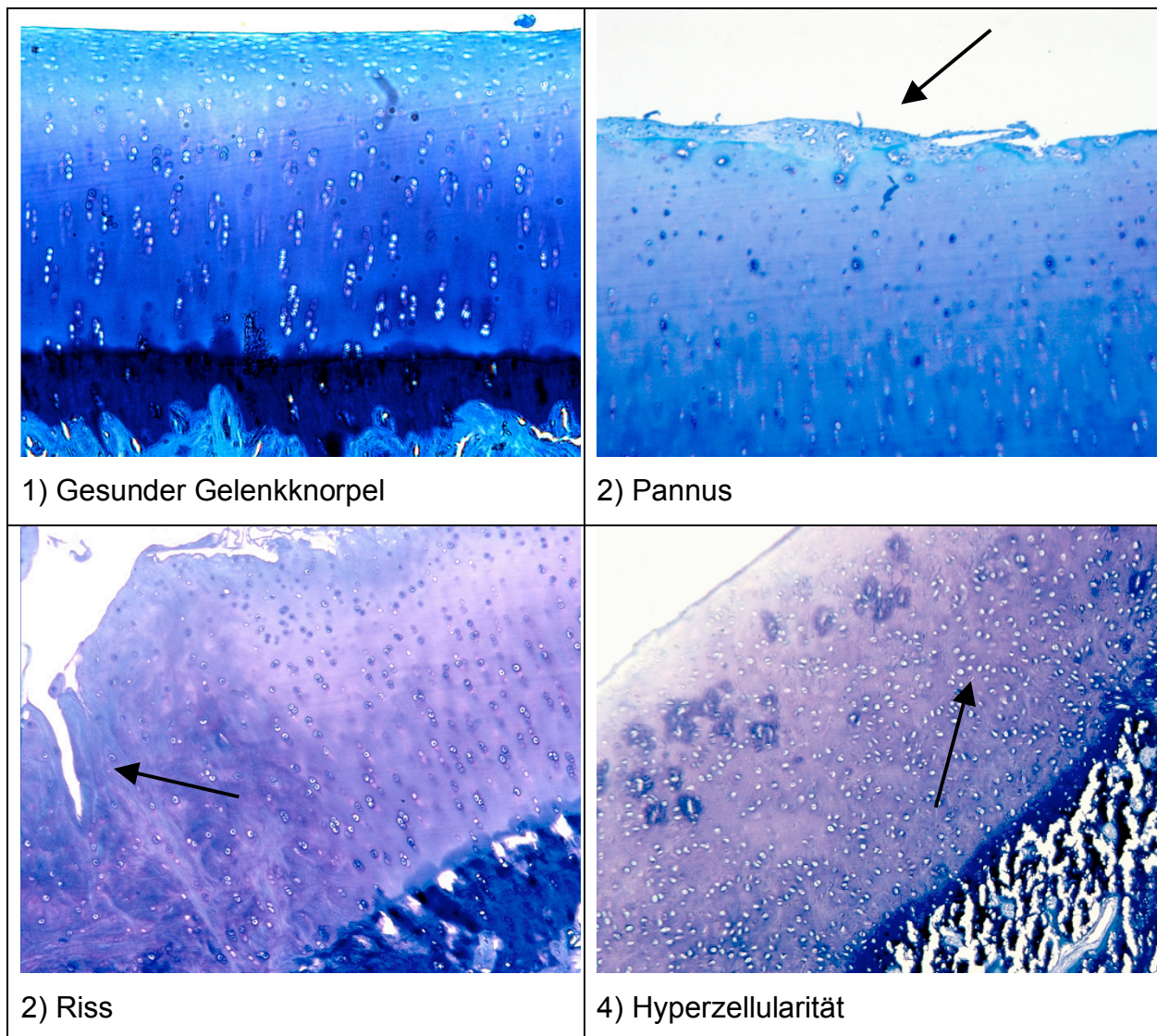


Abbildung 4: Histologische Kriterien nach Mankin

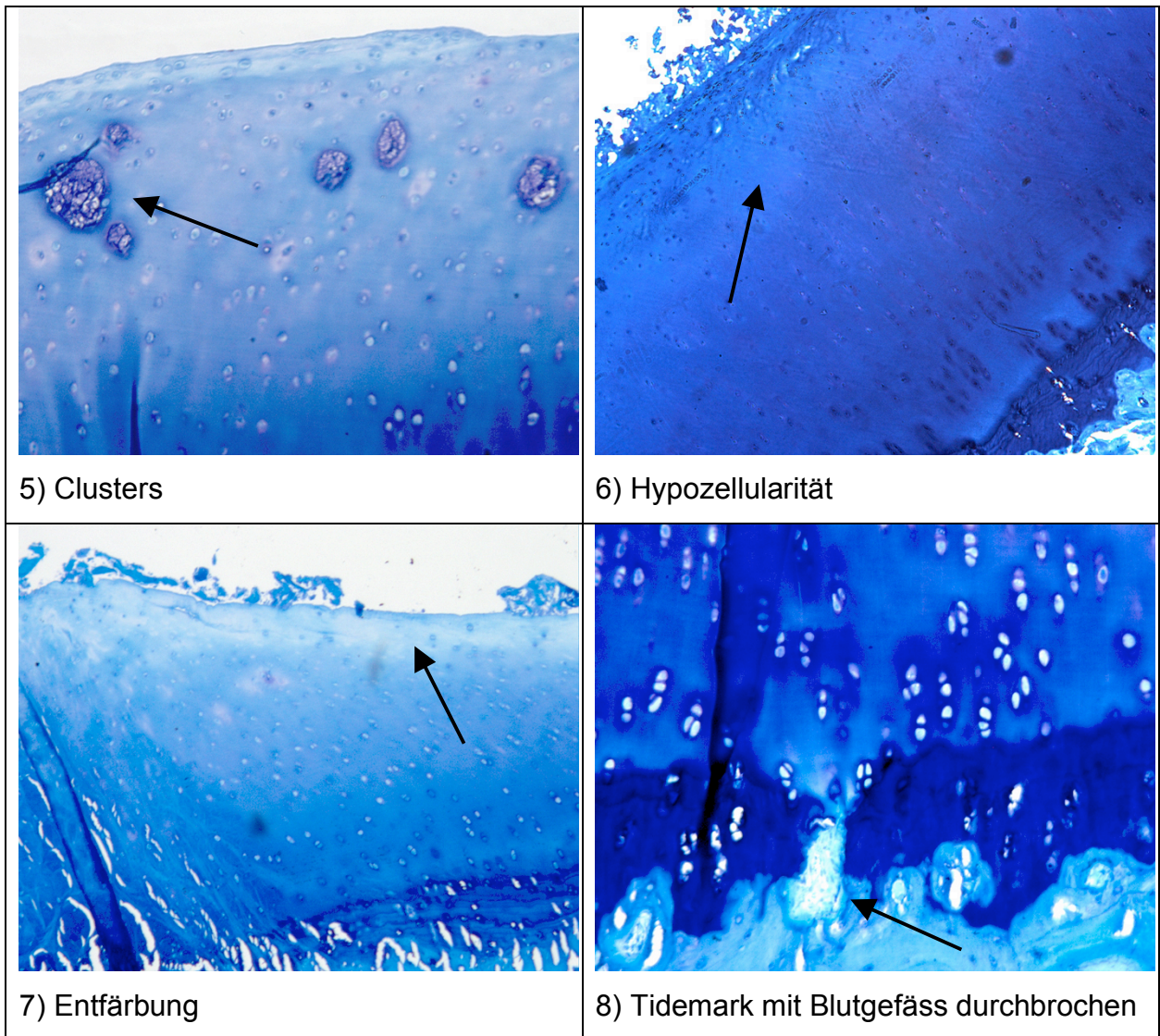


Abbildung 5: Fortsetzung Histologische Kriterien nach Mankin

Die **van Kossa-Färbung** stellt mineralisierten Knochen schwarz dar, während die **McNeal Tetrachrom-Gegenfärbung** das unmineralisierte Osteoid, die noch unreife Knochenvorstufe, als türkisfarbige, hyaline Auskleidung zwischen den schwarz gefärbten subchondralen Knochenbälkchen sichtbar macht. Ist der Knochen wenig aktiv und die Knochensynthese gering, findet sich kaum unmineralisiertes Osteoid. Bei verstärkter Aktivität des Knochenstoffwechsels, wie z.B. bei OA, ist reichlich unmineralisierter Knochen als Auskleidung der Trabekel nachweisbar (siehe Abb. 6). Mit dieser kombinierten Färbemethode können also indirekt pathologische Vorgänge sehr gut festgestellt werden. Die Stoffwechselaktivität zeigt sich zudem in einer Verbreiterung und Verdichtung des subchondralen Knochens.

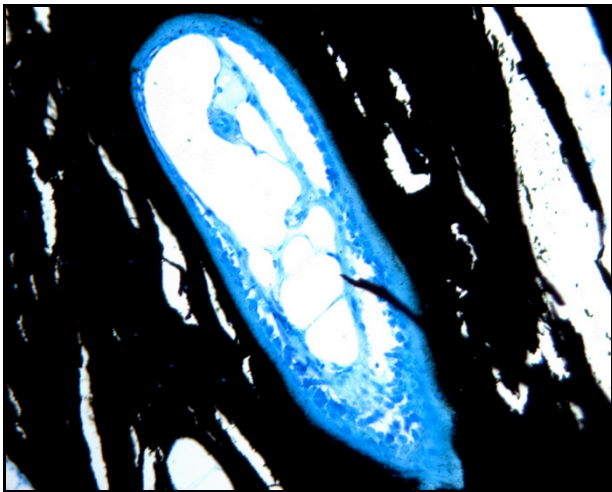


Abbildung 6: Unmineralisiertes Osteoid

Unmineralisiertes Osteoid kleidet die Knochenoberfläche einer sich im Umbau befindenden Bone forming Unit (BFU) im subchondralen Knochen aus.

2.5.2 Immunhistochemie

In osteoarthritischen Gelenken kommt es zu einer erhöhten Kollagen Typ II-Denaturierung. Anfänglich werden allerdings auch vermehrt Kollagene gebildet, die mit einem monoklonalen Antikörper entsprechend lokalisiert werden können [39]. Die neu gebildeten Moleküle sind jedoch häufig schadhaft [40]. Schreitet die Krankheit fort, kommt es letztlich zu einem Kollagendefizit [41]. Die Kollagen Typ II-Fibrillen werden von verschiedenen Proteasen angegriffen. Beispielsweise spaltet Stomelysin-1 (MMP-3) die Kollagenfibrillen an den nichthelikalen Propeptiden, während die Kollagenasen (MMP-1, MMP-13) die einzigen bekannten Proteasen sind, welche die Tripelhelix von Kollagen Typ II entspiralisieren können. Sie spalten die α -Ketten innerhalb des helikalen Teils nach 3/4 der Länge. Es entstehen zwei Fragmente mit einer Länge von 1/4 und 3/4 [42] (siehe Abb. 7). Dadurch werden verborgene Epitope exponiert, die in nativen Molekülen nicht frei sind. Diese Epitope können mit spezifischen Antikörpern detektiert werden [43].

Billinghurst et. al. entwickelten einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der mit einem Epitop (COL 2 3/4C Short) reagiert, das am C-terminalen Ende des 3/4-Fragments liegt, nachdem Kollagen II mit den Kollagenasen MMP-1, MMP-8 oder MMP-13 gespalten wurde [44]. In einer Arbeit von Hollander konnte eine fortgeschrittene Kollagen II-Denaturierung quantifiziert werden, indem ein monoklonaler Maus Antikörper IgG₁ (COL 2 3/4 M) verwendet wurde, der ebenfalls nur mit exponierten Epitopen reagiert. Die Präparate wurden zuvor mit Immunperoxidasen denaturiert. Es wird eine 13-Aminosäure-Sequenz erkannt, die am 3/4-Spaltstück liegt. Es handelt sich um einen sehr spezifischen Antikörper, so dass mit helikalem Kollagen II und auch mit denaturierten Kollagen Typen I, III und X keine Bindung stattfindet [45].

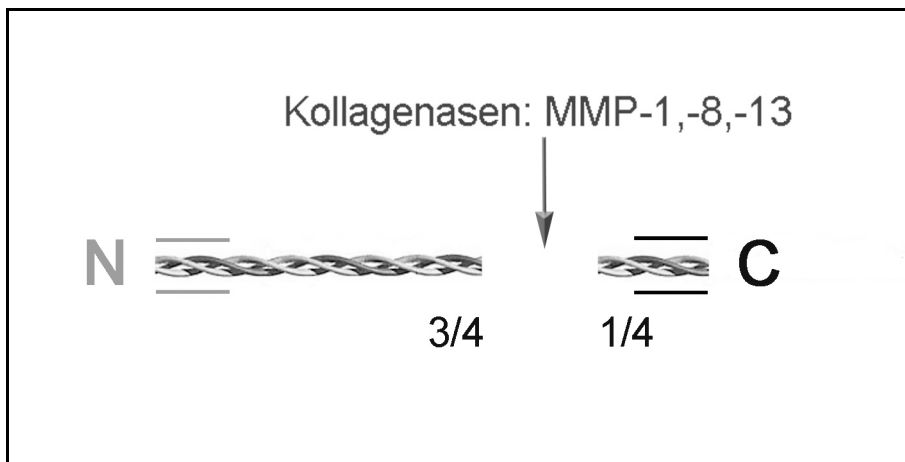


Abbildung 7: Spaltstelle der Kollagen II-Tripelhelix durch Kollagenasen

2.6 Femoroacetabuläres Impingement als Ursache für Osteoarthritis der Hüfte

Hüftbeschwerden stellen bereits im frühen Erwachsenenalter ein verbreitetes Leiden dar. Ein Teil dieser Beschwerden lässt sich anhand klinischer Untersuchungen und radiologischer Diagnostik als Störung im Sinne einer statischen Fehlbelastung aufgrund einer veränderten Hüftmorphologie klassifizieren, wie z.B. bei Hüftdysplasie. Im Gegensatz dazu gibt es eine zweite Gruppe mit Beschwerdensymptomatik und Entstehung von Osteoarthritis, die sich diesem Mechanismus nicht zuordnen lässt. Diese meist sportlich aktiven Patienten beklagen sich häufig über eine langsame Zunahme von Schmerzen in der Leistengegend, die bei intensiver Belastung zunehmen. Langfristig entwickelt sich dann daraus oft eine zunehmende Bewegungseinschränkung, vor allem in Flexion und Innenrotation, die sich auch durch Schmerzen bei längerem Sitzen zeigt.

Radiologische Standard-Auswertungen ergeben oft ein anatomisch normal geformtes, nicht dysplastisches Hüftgelenk, bei dem die klassischen Merkmale, wie reduzierte Gelenkspaltweite, Osteophyten, Sklerosierung und subchondrale Zysten, fehlen [46]. Daraufhin werden häufig muskuläre Probleme und Wirbelsäulen- oder Kniegelenkschäden als Gründe angegeben und erfolglos therapiert. Diese Patienten entwickeln auch häufig eine Osteoarthritis des Hüftgelenks, die lange Zeit als idiopathisch eingestuft wurde. Ein möglicher neuer Erklärungsansatz findet sich in diversen aktuellen Publikationen und wird als „Femoroacetabular-Impingement“ (FAI) bezeichnet. Dabei wird von einem Aufprall- bzw. Einklemm-Konflikt zwischen proximalem Femur und Acetabulumrand ausgegangen [3-8]. Bei gewissen unphysiologischen Hüftgelenkformen kollidieren Bereiche des Kopf-Halsübergangs mit dem Acetabulumrand, vor allem in maximaler Hüftbeugung und Innenrotation. Dies führt zu Labrumrissen und Degeneration oder Abriss des angrenzenden Acetabulumknorpels. Zu den klinischen Symptomen gehört der allmählich entstehende Inguinalschmerz. Der Schmerz kann spontan auftreten oder erst durch Provokations-Manipulation hervorgerufen werden. Dieser typische Schmerz kann durch passive 90°-Flexion, Adduktion und Innenrotation des Oberschenkels („Impingement-Test“) reproduziert werden [3, 4]. Zur weiterführenden Diagnostik hat

sich die Magnetic-Resonance-Arthrographie als Standardverfahren durchgesetzt. Ein positiver Impingement-Test korreliert häufig eng mit den Schäden, die sich mit MR-Arthrographie darstellen.

Verschiedene abnormale Hüftformen können eine Prädisposition für die Impingement-Problematik darstellen. Aufgrund der schädigenden Mechanismen wird zwischen der acetabulären und der femoralen FAI-Form unterschieden [3].

Verursachende Faktoren sind ungünstig geformte Strukturen des Acetabulums bzw. des Femurkopfs. Generell gilt, je grösser die Veränderung, desto ausgeprägter die Einschränkung der Bewegungsfreiheit im Hüftgelenk und auch das Risiko für das Hüftgelenk-Impingement.

Eine verstärkte zirkumferentiale oder partielle Überdachung des Acetabulums über den Femurkopf, wie es bei Hüftprotrusion und Acetabulum-Retroversion angetroffen wird, kann die Bewegung im Hüftgelenk einschränken oder verunmöglichen [47].

Diese Über-Überdachung stellt eine verminderte Clearance in der Artikulationsgegend dar. Dies führt zu verminderter Bewegungsfreiheit und zu einem Anschlagen des Acetabulumrandes an den Femurhals. Dieser Pathomechanismus wird Pincer-Impingement genannt und gehört zur acetabulären Form [4]. Die femorale Form manifestiert sich bei einer asphärischen Femurkopf-Kontur. Die Menschen mit entrundetem Femurkopf besitzen eine ungenügende bzw. verstrichene Taillierung zwischen Kopf und Hals, was im angelsächsischen Sprachgebiet als vermindertes Offset bezeichnet wird (siehe Abb. 8). Am häufigsten werden diese verminderten Offsets cranioventral gefunden [6]. Diese Patienten besitzen dort zudem häufig eine zungenähnliche Ausdehnung des Knorpels in Richtung Femurhals [5]. Durch die ellipsoide Form vergrössert sich der Radius während der Flexionsbewegung, so dass der Femurkopf am Ende der Bewegung gegenüber der Gelenkpfanne zu gross ist. Entweder steht der Femurkopf am Acetabulumrand an oder er wird unter das Labrum gepresst [6, 7]. In beiden Fällen erleiden die Gelenkpartner bei jeder Beugung Mikrotraumen. Die entstehenden Scherkräfte verursachen neben Knorpeldegeneration- bzw. Ablösung auch Labrumrisse am Übergang zum Lunarknorpel [48, 49]. In der Gegend des asphärischen Kopfteils wird der Schaden sichtbar, indem die Farbe des Knorpels deutlich dunkler ist. Dieser Bereich ist leicht von normalem, porzellanfarbigem Knorpel am sphärischen Kopfteil differenzierbar [8]. Wie diverse Arbeiten darlegen, konnte der Ort des grössten Schadens bei den

untersuchten Patienten häufig an derselben Stelle im Gelenk lokalisiert werden [4, 6-8, 10].

Für ältere Menschen mit fortgeschrittener Coxarthrititis hat sich die Hüftprothese als Therapie der Wahl etabliert. Bei jungen Menschen wird eine Gelenkplastik für die Dauer mehrerer Jahrzehnte nicht als optimal angesehen, da aseptische Lockerungen als Komplikationen auftreten können und spätere Revisionen zur Folge haben [50]. Besonders für diese Altersgruppe wäre eine prophylaktische Behandlung weitaus günstiger. Währenddem auf dem Gebiet der Hüftdysplasie, worin Überbelastung im Zentrum steht, schon lange und intensiv geforscht wurde [1], ist eine Prophylaxe gegen Osteoarthritis beim nichtdysplastischen Hüftgelenk noch nicht gefunden worden.

2.7 Tiermodelle

Es existieren bereits mehrere Tiermodelle, welche die Entstehung der Osteoarthritis (OA) zu erklären halfen und die in vier Gruppen eingeteilt werden [51-58].

1. Spontanes Auftreten von OA bei Ratten und Primaten mit Genaberrationen [54]
2. kongenitale Hüft dysplasie bei Hunden
3. iatrogen hergestellte Instabilität des Kniegelenks durch Transsektion des vorderen Kreuzbandes bei verschiedenen Tierarten, wie z.B. bei Hunden und Katzen [51, 52, 55], Meniskotomie bei der Ratte oder Transsektion der medialen Seitenbänder und des Lig. meniscofemorale [56, 57]
4. akute, transartikuläre Belastung des Femoropatellargelenks beim Hund [58]

Während diese Versuche generalisierte, degenerative Veränderungen im Knorpel hervorrufen, hat das vorliegende Modell das Ziel, die Ursachen des Impingements nachzuahmen. Bei diesem Modell war nicht die Gelenkinstabilität das auslösende Moment für OA, sondern die sich in der Bewegung wiederholenden Impingement-Traumen, welche die beim Menschen beschriebenen frühen Veränderungen im Hüftgelenk reproduzieren.

2.8 Das Schaf als Versuchstier

An ein Versuchmodell werden diverse Anforderungen gestellt, die möglichst vollständig erfüllt werden sollten. Generell werden Nager, Katzen, Hunde, Schafe und Primaten als Versuchstiere eingesetzt [51, 52, 54-58]. Nager eigneten sich nicht, da sie für unseren Versuch ein zu geringes Körpergewicht besitzen. Katzen und Hunde schieden vor allem aus ethischen Gründen aus. Primaten wären wegen ihrer phylogenetischen Herkunft dem Menschen am nächsten [59], kamen aber aus anatomischen, ethischen und finanziellen Gründen nicht in Frage. Als Versuchstier wurde das Schaf gewählt. Es hat eine angenehme Grösse, besitzt ein ruhiges Wesen, ist genügsam und erreicht im Erwachsenenalter ein mit dem Menschen vergleichbares Körpergewicht. Diese Spezies weist zudem eine ähnliche Stoffwechselgeschwindigkeit des Skelettsystems auf wie der Mensch [59]. Erfahrungsgemäss belasten und bewegen operierte Schafe ihre Gliedmassen schnell wieder, was für die OA-Bildung erwünscht ist. Die wichtigste Anforderung für die vorliegende Arbeit erfüllt die Anatomie des Schaf-Hüftgelenks, welche sich durch die unrunde Form des Femurkopfes, wie bereits in der Einleitung beschrieben, als Modell anbietet (siehe Abb. 8). Zudem besitzt das Schaf einen Lunarknorpel, der jenem des Menschen vergleichbar ist. Ein deutlicher Unterschied zwischen Mensch und Schaf zeigt sich jedoch in der Stellung des Hüftbeins (siehe Abb. 9). Ein wichtiger Faktor ist, dass beim Schaf keinerlei spontan auftretende, degenerative Hüfterkrankungen bekannt sind, die das Ergebnis verfälschen würden.

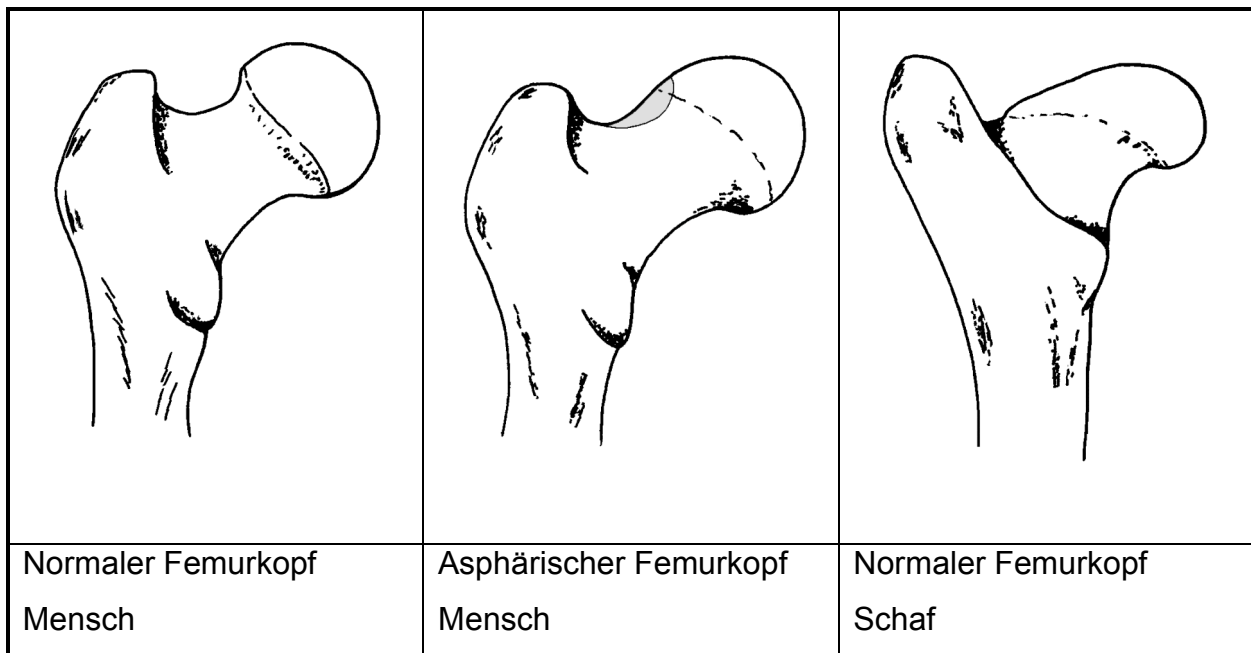


Abbildung 8: Vergleich Femurkopf-Formen

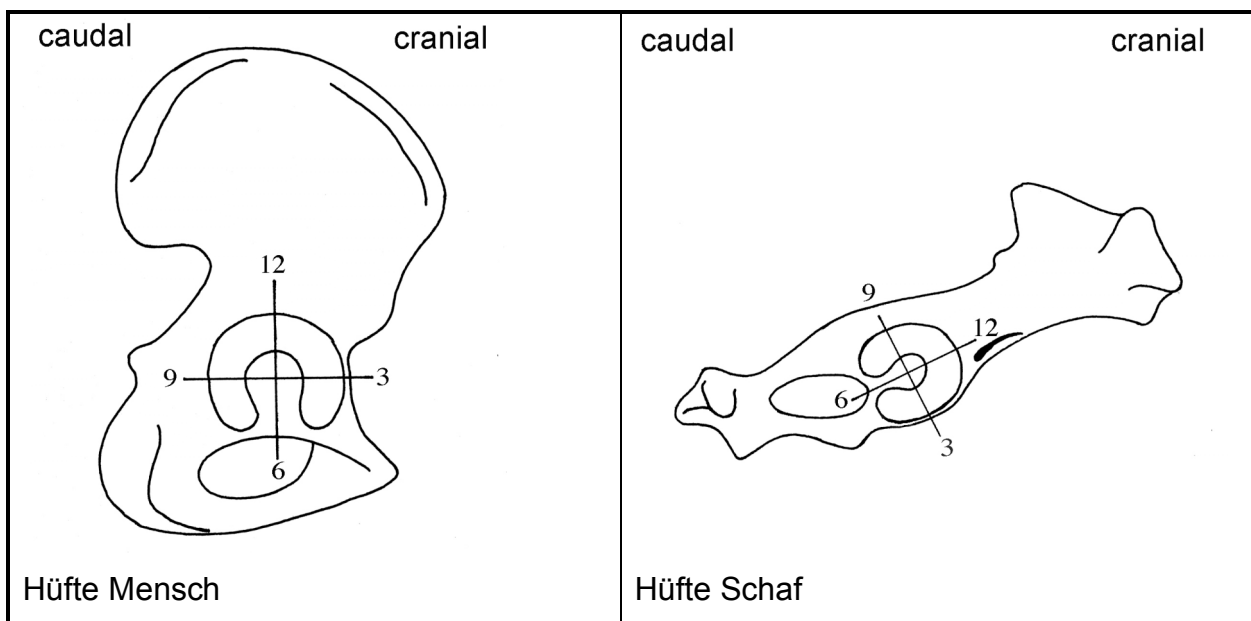


Abbildung 9: Stellung der Hüfte bei Mensch und Schaf

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Aufbau der Studie

In die vorliegende Studie wurden 16 Schafe als Versuchstiere einbezogen. Je 4 Schafe wurden in eine Gruppe zusammengefasst. Es wurden 4 Gruppen mit unterschiedlichen Laufzeiten (Zeitraum zwischen Operation und Euthanasie) gebildet wurden (siehe Tab. 1).

Laufzeit in Wochen	Schafnummer	OP-Seite	Gewicht in kg
Gruppe 1 14 Wochen	1019	Links	54
	1020	Links	76
	1021	Rechts	59
	1022	Rechts	56
Gruppe 2 22 Wochen	1005	Rechts	57
	1006	Rechts	58
	1008	Rechts	55
	1018	Links	53
Gruppe 3 30 Wochen	1011	Links	64
	1012	Links	64
	1016	Links	62
	1017	Rechts	48
Gruppe 4 38 Wochen	1009	Links	68
	1013	Rechts	75
	1014	Rechts	64
	1015	Links	60

Tabelle 1: Versuchstieraufstellung

Für den Tierversuch (Bewilligungs-Nr. 18/2004) wurden adulte weibliche Schafe im Alter zwischen 1.8 – 3.6 Jahren eingesetzt. Alle Tiere wurden im Rahmen einer Ankaufsuntersuchung auf Allgemein- und Ernährungszustand sowie auf Augen- und Eutergesundheit geprüft. Sämtliche Tiere wurden einer antiparasitären Behandlung mit 1 ml/10 kg p.o Triclobendazol/Levamisolhydrochlorid (Endex[®], Novartis, Basel, Schweiz) und 1 ml/50 kg s.c. Ivermectinum (Ivomec Plus[®], Biokema, Crissier, Schweiz) unterzogen. Zudem wurde gegen Clostridieninfektionen mit 2 ml/Tier s.c. als Antigen mit dem Toxoid von Clostridium welchii Typ D/Tetanus-Anatoxin (Pulpivax[®], Berna Veterinärprodukte AG, Bern, Schweiz) geimpft. Um eine sehr frühe, mit Sonographie nicht diagnostizierbare Trächtigkeit abzubrechen, wurden allen Tieren nach negativem Ultraschallbefund eine erste Dosis während der Ankaufsuntersuchung und 10 Tage später eine zweite Dosis 1.5 ml/Tier i.m. Prostaglandine F_{2α} (Dinolytic[®], Pfizer AG, Zürich, Schweiz) appliziert. Zur bestandeseigenen Kennzeichnung wurden Ohrmarken (Allflex) eingezogen. Mittels Vacutainer (Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK) wurde an der Vena jugularis Blut entnommen und im Serum der Maedi/Visna-Titer am virologischen Institut des Tierspitals der Universität Bern bestimmt. Nur Tiere mit seronegativem Befund wurden eingesetzt.

3.2 Verwendete Instrumente

Es wurden das übliche Standardbesteck und Kleinfragmentenset der Firma Synthes, Oberdorf, Schweiz, verwendet. Zusätzlich wurden Bohrmaschine, oszillierende Säge, Hammer, Meissel, Plattenbiegegerät, Repositionszangen, diverse Wundhaken und Rongeurs sowie Kauter und eine Absaugpumpe eingesetzt.

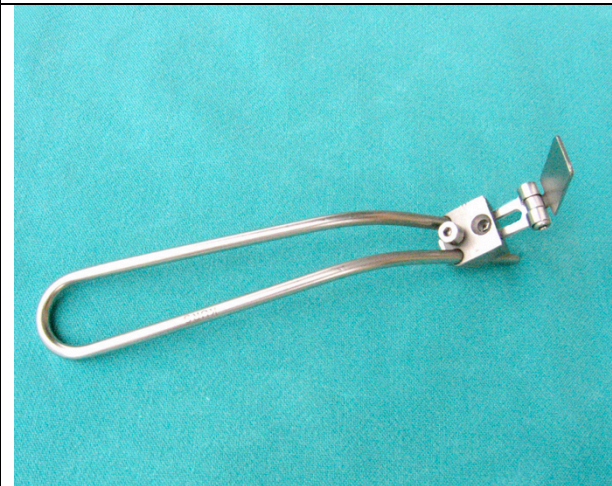
Im Speziellen wurden für die intertrochantäre Varisationsosteotomie folgende, sterile Kleintier-Instrumentarien der Firma Synthes, Oberdorf, Schweiz, gebraucht (siehe Abb. 10)



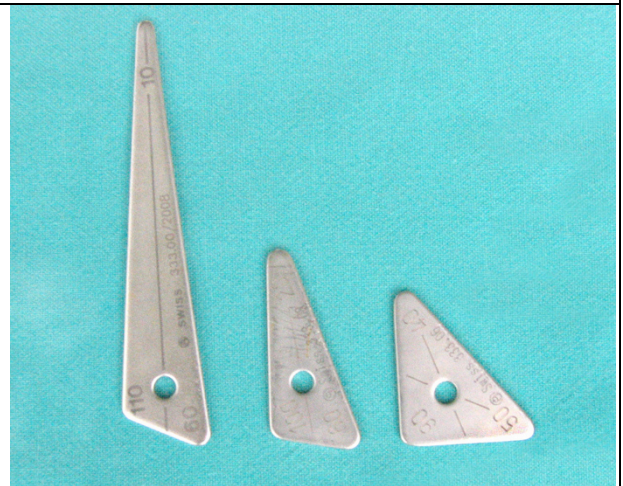
3.2-mm Spezialbohrer mit Anschlag
(Nr.380.03)



Bohrlehre mit Arretierungsstiften
(Nr. 380.01)



Zielgerät für oszillierende Säge (Nr. 380.07)



Winkeldreiecke (Nr. 333.00/.06/.08)



Sägeblätter für oszillierende Säge



Doppelhakenplatte 5-Loch (Nr. 285.05)

Abbildung 10: Kleintier-Instrumentarium für Varisationsosteotomie

3.3 Vorbereitung

Die Schafe wurden 2 Wochen präoperativ aus der Weidenhaltung genommen, im Tierspital Zürich eingestallt und beobachtet. Die Tiere wurden erneut auf Allgemein- und Ernährungszustand, Augen- und Eutergesundheit überprüft und die Klauen kontrolliert bzw. geschnitten. Eine Woche vor der Operation wurde mittels Vacutainer (Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK) Blut aus der Vena jugularis entnommen und die Werte der Hämatologie (kleiner Status aus EDTA-Blut) sowie der Blutchemie (Substrate, Enzyme, Elektrolyte aus Serum) im Labor des Tierspitals Zürich bestimmt. Am Vortag wurde das Operationsfeld und auf der gleichen Körperseite ein Areal im Bereich der Vena jugularis geschoren und das Körpergewicht ermittelt. 24 Stunden vor der Operation wurde das Versuchstier in einen separaten, mit Holzspänen eingestreuten Stall in der Nähe des Operationssaals gebracht und das Futter entzogen. Am Morgen vor der Operation wurde die rektale Temperatur gemessen, Herz, Pansen und Lunge auskultiert und die Narkose eingeleitet.

Je nach Anästhesieprotokoll wurden 30 Minuten präoperativ entweder 0.01 mg/kg Buprenorphin (Temgesic®, Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) zur Analgesie sowie 0.2 mg/kg Xylazin (Rompun® 2 %, Provet AG, Lyssach, Schweiz) / bzw. 5 µg/kg Medetomidin (Domitor®, Dr. Gräub AG, Bern, Schweiz) zur Sedation separat aufgezoogen und i.m. verabreicht, oder aber 30 Minuten vor Operationsbeginn 0.01 mg/kg Buprenorphin (Temgesic®, Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) alleine i.m. gespritzt, und die Sedation unmittelbar vor OP-Beginn in den zuvor gelegten Verweilkatheter gegeben.

Kurz vor der Operation wurde der Hals im Bereich der Vena jugularis nach gebräuchlicher Methode gewaschen (Hibiscrub®, SSL Healthcare Schweiz AG, Reinach/BL, Schweiz), mit Alkohol entfettet und desinfiziert (Hibitane®, SSL Healthcare Schweiz AG, Reinach/BL, Schweiz). Im oberen Halsdrittel wurde um die geplante Kathetereinstichstelle ein Depot mit 1 ml Lidocain-Hyaluronidase 2 %. s.c. (G. Streuli & Co AG, Uznach, Schweiz) gespritzt. Unter Stauung der V. jugularis erfolgte das Legen des Verweilkatheters (Vygonüle S, Vygon, Aachen, Deutschland) und dann das Annähen (Supramid® 1, B. Braun, Aesculap AG, Tuttlingen,

Deutschland). Danach wurde der Katheter mit steriler, physiologischer NaCl-Lösung (B. Braun, Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz) gespült und die Prämedikation bzw. die perioperative Antibiose appliziert:

- Analgesie und Entzündungshemmung mit 4 mg/kg Caprofen i.v. (Rimadyl®, Pfizer AG, Zürich, Schweiz)
und
- Antibiose i.v. mit 30.000 IU/kg löslichem Penicillin natrium (G. Streuli & Co. AG, Uznach, Schweiz) und 6 mg/kg Gentamycin ut sulfas (G. Streuli & Co. AG, Uznach, Schweiz) über den Verweilkatheter

Die Einleitung erfolgte mit 2 mg/kg Ketamin (Narketan®, Vétoquinol AG, Bern, Schweiz) und 0.1 mg/kg Diazepam (Valium®, Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz) in einer Mischspritze i.v. und mit 2-4 mg/kg Propofol i.v. in separater Spritze nach Wirkung.

Nachdem das Tier bewusstlos war, konnte es intubiert werden. Die Narkose wurde unter Inhalationsanästhesie mit Isofluran, Lachgas und O₂ je nach Anästhesieprotokoll unterhalten.

Die Lagerung erfolgte in Seitenlage mit der zu operierenden Gliedmasse oben. Das zu operierende Bein wurde mit Zellstoffrollen in waagrechter Stellung positioniert und stabilisiert. Das OP-Feld wurde sauber nachgeschoren und nach gängiger Methode antiseptisch gewaschen (Hibiscrub®, SSL Healthcare Schweiz AG, Reinach/BL, Schweiz), mit Alkohol entfettet und desinfiziert (Hibitane®, SSL Healthcare Schweiz AG, Reinach/BL, Schweiz).

3.4 Operation

OP-Feld:

Für grösstmögliche Keimfreiheit wurden ein steriles Tuch und Klebeband um den Fuss der zu operierenden Hintergliedmasse gewickelt. Die Umgebung des Operationsgebiets wurde mit weiteren Tüchern steril abgedeckt und mit Tuchklemmen befestigt.

Hautschnitt:

Der ca. 18 cm lange, nach caudal konvexe, bogenförmige Hautschnitt lief in dorsoventraler Richtung von einem Punkt wenig caudal des Trochanter major in Richtung Kniegelenk.

Zugang:

Der Zugang erfolgte von proximal zwischen dem M. gluteus medius und dem M. gluteus superficialis und wurde nach distal zwischen dem M. vastus lateralis und M. gluteobiceps erweitert (siehe Abb. 11-1).

Präparation:

Zur Darstellung des Hüftgelenks wurde die Fascia lata am cranialen Rand des M. gluteobiceps gelöst und mit Langenbeck-Haken nach caudal gezogen. Der M. gluteus superficialis wurde am cranialen Rand von der Faszie abgetrennt und nach caudal verlagert. Die Präparation des M. vastus lateralis und internus vom Femur erfolgte unter Schonung des N. ischiadicus. Der M. vastus wurde aus dem OP-Bereich gehalten (siehe Abb. 11-2).

Varisationsosteotomie:

Die vorgesehene Osteotomielinie auf der Höhe des Trochanter minor wurde mit dem Kauter auf dem Periost des Femurs markiert.

Unter Schonung der Weichteile mit Hohmannhebeln wurde die Bohrlehre so auf die caudolaterale Seite des Femurs gelegt, dass der Kopf der Bohrlehre am Trochanter

major anstand, die Platte der Bohrlehre parallel zur Femurachse verlief, und die Markierungskerbe zwischen Kopf- und Schwanzstück der Bohrlehre auf der vormarkierten Linie am Femur lag (siehe Abb. 11-3 bzw. 12-1 und 12-2).

Mit dem 2-mm-Bohrer wurde durch die proximale 2-mm-Bohrhülse im Kopf der Bohrlehre ein Kanal in den Trochanter major gebohrt und der 2-mm-Arretierungsstift durch die Hülse in den Knochen geschoben. Dann wurde zuerst mit dem Spezialbohrer durch die craniale 3.2-mm-Bohrhülse bis zum Anschlag in den Trochanter major gebohrt, der 3.2-mm-Arretierungsstift eingesetzt und anschliessend durch die caudale 3.2-mm-Bohrhülse bis zum Anschlag gebohrt.

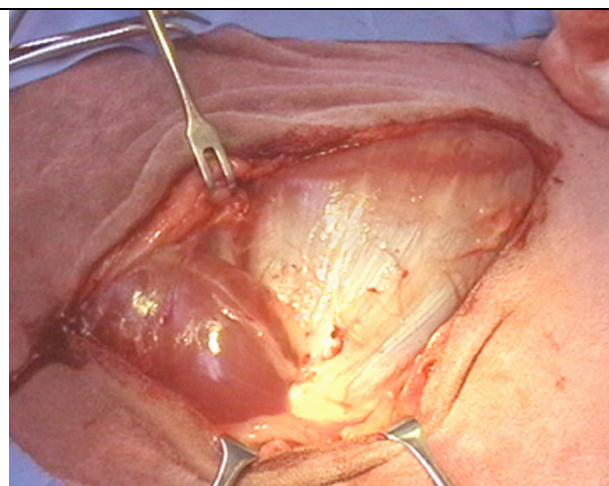
Das Zielgerät für die oszillierende Säge wurde in die 2 vorgebohrten 3.2-mm-Bohrkanäle gestossen und die verschiebbare Führungsplatte so verschoben, dass das an den Flügel angelegte Sägeblatt genau auf die Markierung am Femur zu liegen kam. Mit den Winkeldreiecken wurde der Winkel zwischen schwenkbarem Flügel und Femurachse für die erste Osteotomie im 90°-Winkel zur Femurachse eingestellt (siehe Abb. 11-4 bzw. 12-3). Um einer Weichteilverletzung mit der Säge vorzubeugen, wurden die beiden Hohmannhebel genau in Position gehalten. Das Sägeblatt der oszillierenden Säge wurde auf den Flügel des Zielgerätes gelegt und ohne Verändern des Winkels unter ständiger Flüssigkeitskühlung mit steriler, physiologischer NaCl-Lösung (Fresenius Kabi AG, Stans, Schweiz) gesägt. Die erste Osteotomie wurde im medialen Cortex nur partiell durchgeführt, um bei der zweiten Osteotomie mehr Stabilität zu behalten. Für die zweite Osteotomie wurde der Flügel vom Zielgerät um 15° gekippt, wieder festgeschraubt, und die Führungsplatte leicht nach proximal verschoben (siehe Abb. 12-4). Die zweite Osteotomie erfolgte vollständig durch beide Cortices (siehe Abb. 13-5). Die beiden Schnittlinien lagen somit in einem nach medial offenem Winkel von 15° zueinander (siehe Abb. 11-5). Anschliessend wurde der entstandene Knochenkeil des Femurs vollständig freigesägt (siehe Abb. 13-6) und mit einem Raspatorium entfernt. Die beiden Femurenden wurden so reponiert, dass die lateralen Cortices möglichst stufenlos aneinander lagen. Die Führungsplatte des Zielgerätes wurde entfernt und an dieser Stelle eine Aluminium-Schablone aufgelegt und angedrückt (siehe Abb. 13-7). Die

Doppelhakenplatte wurde nach der Schablone in Passform gebogen. Anschliessend wurde das Zielgerät entfernt.

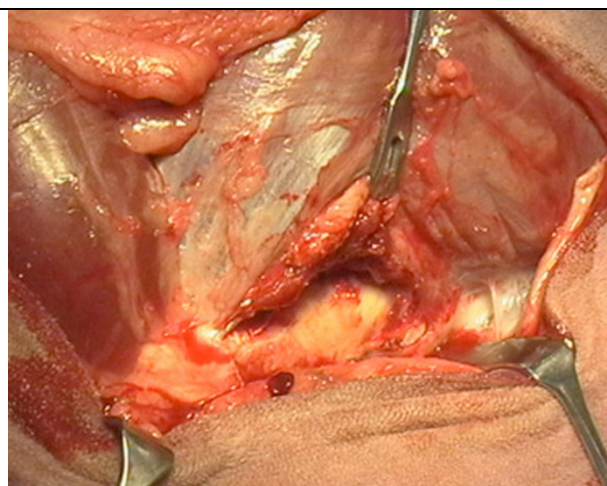
Die sich am proximalen Ende befindenden Doppelhaken wurden in die 3.2-mm-Bohrlöcher im Trochanter major geschoben und mit dem Hammer vollständig bis zum Anschlag versenkt. Das distale Ende der Doppelhakenplatte wurde lateral entlang des Femurschaftes parallel zur Femurachse positioniert. Dabei wurde mit Hilfe der Kautermarkierung darauf geachtet, dass keine Ante- oder Retroversion des Femurkopfes entstand. Es wurden 5 Löcher gebohrt, die Tiefe der Bohrkanäle gemessen und das Gewinde geschnitten. Die erste Schraube wurde zentrisch und senkrecht im obersten Loch versenkt und presste die Doppelhakenplatte fest in den Trochanter major. Die zweite Schraube wurde schräg in Richtung des Femurkopfs eingeschraubt. Der Osteotomiespalt lag zwischen diesen beiden Schrauben. Die weiteren drei Schrauben wurden im 90°-Winkel zur Femurachse und exzentrisch zur Komprimierung des Osteotomiespalt es eingeschraubt (siehe Abb. 11-6 bzw. 13-8). Die Spülung der Wunde erfolgte mit steriler, physiologischer NaCl-Lösung (Fresenius Kabi AG, Stans, Schweiz).

Wundverschluss:

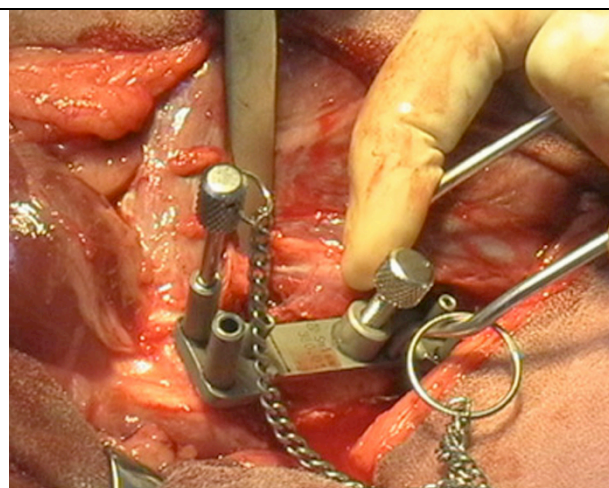
Der Wundverschluss erfolgte mit resorbierbarem Nahtmaterial (Polyglactin, Vicryl® 2-0, Johnson&Johnson Int., Brüssel, Belgien). Der M. vastus intermedius wurde über die Platte gezogen und mit der Faszie mit einer Kürschnernaht vernäht. Der M. vastus lateralis wurde an der Insertion fixiert. Anschliessend wurden schichtweise Fettgewebe, Faszien und Subcutis ebenfalls mit Kürschnernähten adaptierend verschlossen. Der Verschluss der Cutis erfolgte mit dem Stapler (Appose ULC, United States Surgical, USA). Über die Hautwunde wurde ein längs gefalteter Gazetupfer mit 6 Einzelknopfnähten fixiert.



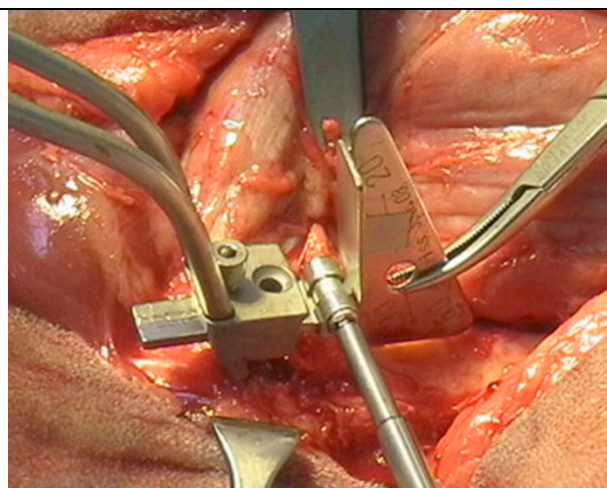
11-1) Zugang



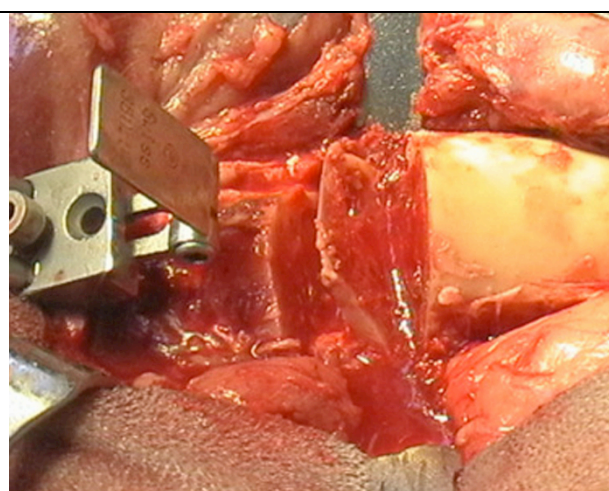
11-2) Präparation



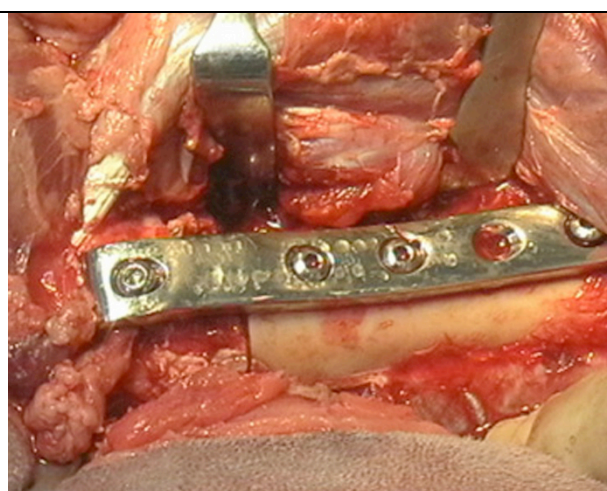
11-3) Positionierung der Bohrlehre



11-4) Bemessen der Osteotomie

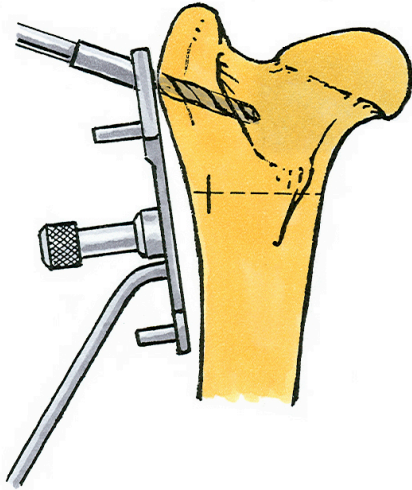


11-5) Knochenkeil

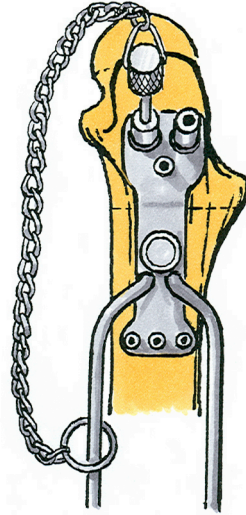


11-6) Reduktion mit Doppelhakenplatte

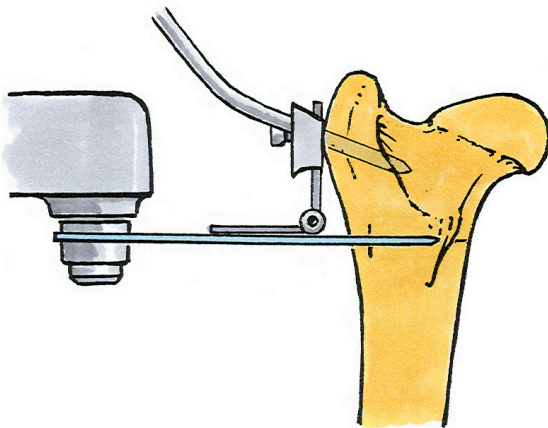
Abbildung 11: Operationstechnik



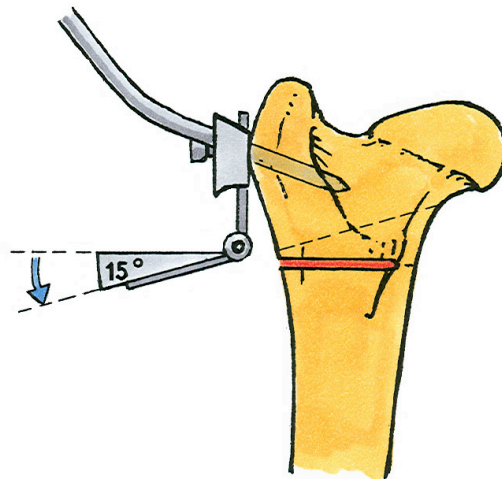
12-1) Bohrlehre - Ansicht von caudal



12-2) Bohrlehre - Ansicht von lateral

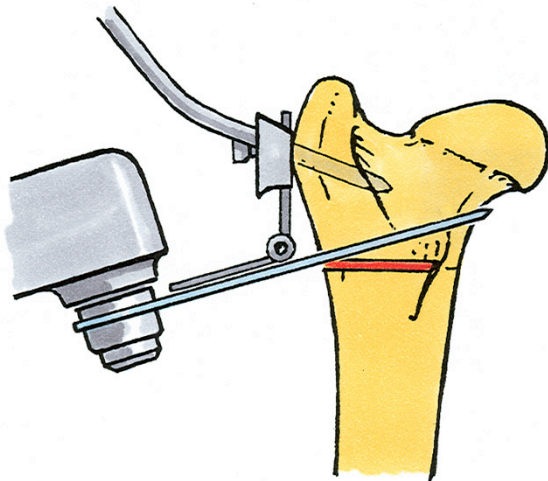


12-3) Erste Osteotomie im 90°-Winkel

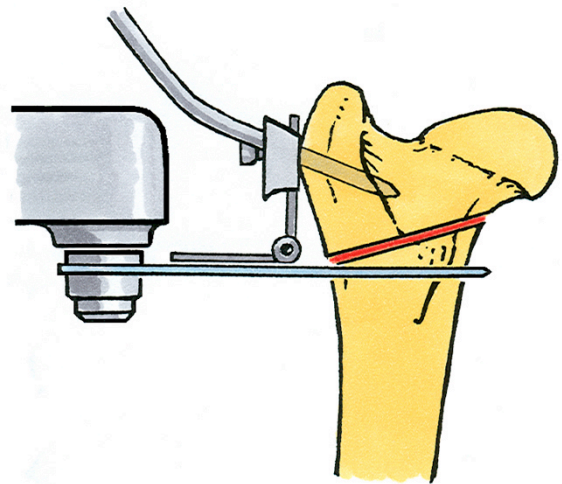


12-4) Flügelplatte um 15° kippen

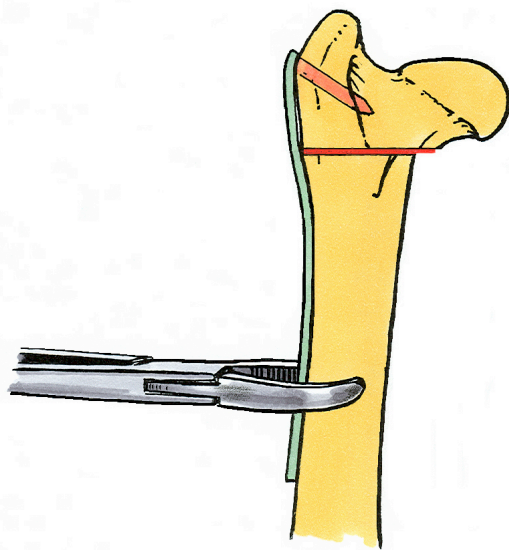
Abbildung 12: Varisationsosteotomie [Schritt 1 - 4]



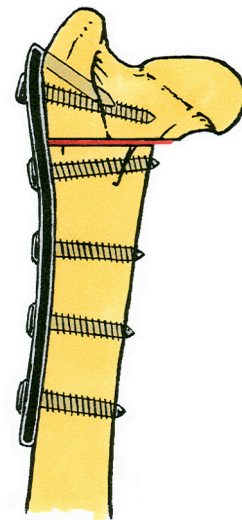
13-5) Zweite Osteotomie



13-6) Freisägen des Knochenkeils



13-7) Anpassen der Aluminiumschablone



13-8) Fixierte Doppelhakenplatte

Abbildung 13: Fortsetzung Varisationsosteotomie [Schritt 5-8]

3.5 Postoperatives Management

Unmittelbar nach Operationsende wurde das anästhesierte Schaf in der Radiologie-Abteilung des Tierspitals, Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich geröntgt. Um das Operationsergebnis der Varisation zu überprüfen, wurden je zwei Röntgenbilder der Hüfte hergestellt. Für die erste Aufnahme wurde das Schaf in Rückenlage gelagert, die Hüfte in ca. 30°-Flexion gebracht, die Beine um ca. 20° abduziert und mit Sandsäckchen fixiert. Es wurden beide Hüftgelenke in ventrodorsalem Strahlengang belichtet. Die eingesetzten Schrauben waren parallel zum Röntgenbild sichtbar. Für das zweite Bild wurde das Schaf in leichte Seitenlage gelegt und die Hüfte mit ca. 30°-Flexion gelagert. Das Bein der operierten Hüftseite lag flach auf der Röntgenplatte und das nichtoperierte Bein wurde im 90°-Winkel gegenüber der Röntgenplatte fixiert. Die operierte Hüfte wurde in mediolateralem Strahlengang abgelichtet. Hier wurden die Schrauben und die Doppelplatte senkrecht zur Bildebene dargestellt.

Nach der Extubierung wurde das Schaf in den Stall gebracht. Um das Abspringen von Schraubenköpfen oder Plattendeformationen zu verhindern, wurden die Tiere für die Aufwachphase und vier weitere Wochen in einem Hängernetz gehalten (siehe Abb. 14). Die Aufwachbetreuung erfolgte bis das Schaf frass und sicher auf den eigenen Beinen stand.



Abbildung 14: Hängesystem
(Schaf Nr. 1014)

Nach der Operation erhielt das Schaf als Schmerzmittel im Abstand von je 4 Stunden 2 - 3 weitere Dosen 0.01 mg/kg Buprenorphin i.m. (Temgesic[®], Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz).

Zur Infektionsprophylaxe wurden während den folgenden drei Tagen 30.000 IU/kg lösliches Penicillin natrium i.v. (G. Streuli & Co. AG, Uznach, Schweiz), 6 mg/kg Gentamycin ut sulfas i.v. (G. Streuli & Co. AG, Uznach, Schweiz) 2 x täglich und 4 mg/kg Caprofen i.v. (Rimadyl[®], Pfizer AG, Zürich, Schweiz) 1 x täglich intravenös appliziert. Am dritten Tag wurde der Verweilkatheter gezogen und die Medikation abgesetzt.

Nach vier Wochen Hängesystem wurde das operierte Schaf zur Wiederangewöhnung an den Freilauf für einen Monat in einer kleinen Laufboxe untergebracht. Zwei Monate nach der Operation wurde das Schaf nochmals in Vollnarkose gelegt, geröntgt und bei zufriedenstellender Knochenheilung in eine grössere Boxe verbracht.

3.6 Probengewinnung

Nach 14, 22, 30 bzw. 38 Wochen wurden die Schafe geschlachtet. Die Betäubung erfolgte mit einem Bolzenschussapparat. Der Tod trat durch den Schnitt in die Halsgefäße durch Entbluten ein. Von den Hüften wurden nochmals zwei Röntgenbilder erstellt. Anschliessend wurden die Muskeln um beide Hüftgelenke wegpräpariert, die nichtoperierte Hüfte diente als Kontrolle. Als erster Schritt der Probenentnahme wurde unter sterilen Kautelen mit einer Spritze und 18G Kanüle möglichst viel Synovia aus dem Gelenkspalt entnommen, unverzüglich zentrifugiert, der zellfreie Überstand mit einer Pipette aufgezogen und bei - 80° C tiefgefroren. Nach Eröffnung des Hüftgelenkes wurden die makroskopisch erfassbaren Veränderungen fotografisch festgehalten, schriftlich und mit Zeichnungen deskriptiv dokumentiert. Für die Knorpelprobenentnahme wurde das Acetabulum gemäss der Abbildung 15: „Sektoren am Acetabulum“ in Anlehnung an ein Zifferblatt in die drei Sektoren, 7-9, 12-2, 4-6 Uhr eingeteilt und mit den Buchstaben A, B, C gekennzeichnet. Die Entnahmestelle am Femurkopf wurde gemäss der Abbildung 16: „Schnittlinie am Femurkopf“ auf einer Linie zwischen der Fovea capitis ossis femoris Richtung Trochanter major bis zum Collum ossis femoris festgelegt. Mit dem Skalpell und einer 10er Klinge wurden im Acetabulum-Sektor 7-9 der Facies lunata 2 und an der beschriebenen Stelle am Femurkopf 1 Knorpelchip mit je ca. 3 mm Durchmesser und ca. 1 mm Dicke entnommen. Je ein Knorpelchip vom Acetabulum und vom Femurkopf wurde in kleinen Petrischalen in Flüssigstickstoff tiefgefroren und anschliessend bei - 24° C bis zur immunhistochemischen Analyse gelagert. Der zweite Knorpelchip vom Acetabulum wurde in RNAlater (Quiagen) während 48 Stunden bei 4° C fixiert und anschliessend bei -24° C bis zur Verarbeitung tiefgefroren. Mit einer oszillierenden Säge wurden am Acetabulum in den Sektoren 7-9, 12-2 und 4-6 ca. 8 mm dicke Segmente mit Knorpel und subchondralem Knochen herausgesägt. Dem Femurkopf wurde mit der gleichen Säge an der beschriebenen Stelle ein ca. 4 mm dicker Kegel mit Knorpel und subchondralem Knochen entnommen. Die herausgesägten Gelenkstücke wurden in Falcon-Tubes gelegt und mit 4 % Formalin im Verhältnis 1:10 (Probenvolumen:Formalin) übergossen.

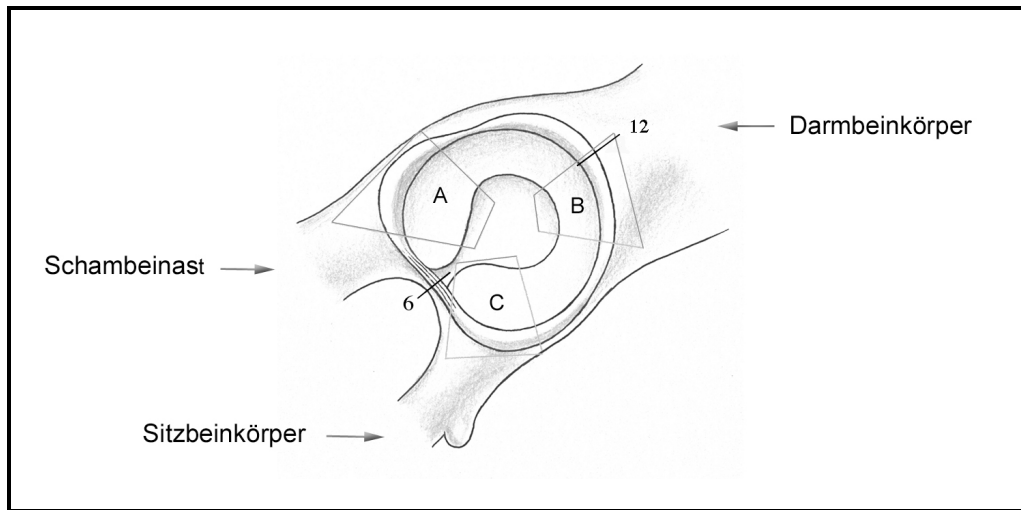


Abbildung 15: Sektoren am Acetabulum

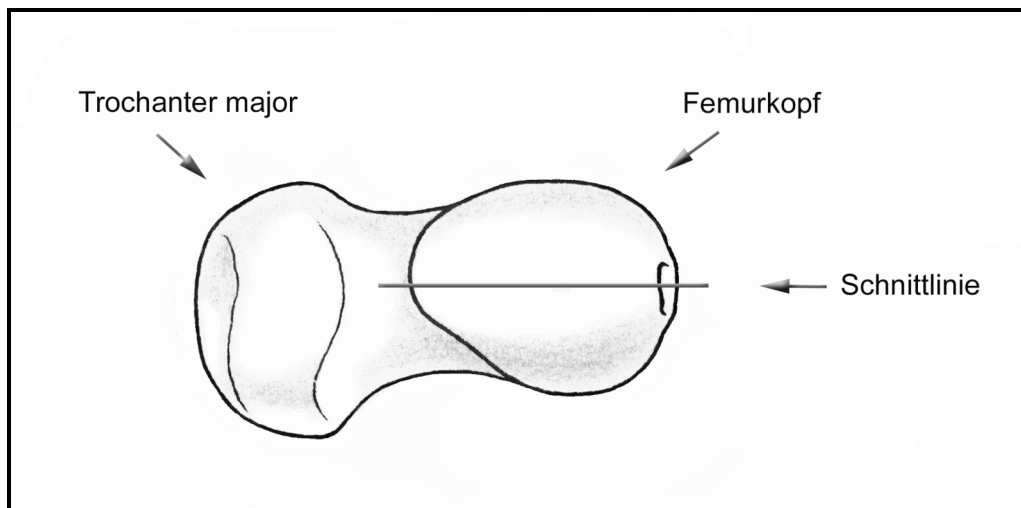


Abbildung 16: Schnittlinie am Femurkopf

3.7 Probenaufbereitungs-, untersuchungs- und auswertungsmethoden

3.7.1 Makroskopische Auswertung deskriptiv / nach Bauer / nach Outerbridge

Acetabulum und Femurkopf wurden, wie im Kapitel „Probengewinnung“ beschrieben, in Sektoren eingeteilt. Jeder Sektor wurde separat bewertet. Aufgrund der fotografischen, schriftlichen sowie gezeichneten Dokumentationen wurden die mit blossen Auge erkennbaren Veränderungen gemäss den unten aufgeführten Schemata beurteilt.

Deskriptive Auswertung:

Anzahl Veränderungen am Labrum

- Rötung/Längsriss
- Auffaserung/Einriss
- Degeneration

Anzahl Veränderungen am Übergang Labrum/Knorpel

- „Teppichphänomen“
- Längsriss/Auffaserung

Anzahl Veränderungen am Knorpel

- Rötung/Ausdünnung
- Aufrauhung
- Einriss
- Flap
- Abrasion

Unter dem Begriff „Teppichphänomen“ wird das beim FAI typischerweise angetroffene Bild verstanden, welches eine Ablösung des Knorpels vom subchondralen Knochen mit einer teppichähnlichen Verschiebbarkeit und „Wellbarkeit“ des Knorpels darstellt.

Klassifizierung nach Bauer:

Diese anschauliche makroskopische Beschreibung eignete sich für unseren Versuch und wurde unverändert übernommen (siehe Abb. 17).

- Typ I) Linearer Riss - manchmal bis auf den subchondralen Knochen
- Typ II) Sternförmiger Riss - oft mit zersplittertem Zentrum
- Typ III) Flap oder Lappen - an der Spitze angehobenes Knorpelstück, welches an der Basis noch befestigt ist
- Typ IV) Krater - abgesprungener Knorpelchip, meist über die volle Knorpeldicke
Unter den Läsionsrändern oft Ablösung vom subchondralen Knochen
Die Läsionen zeigen einen scharfen Rand
- Typ V) Fibrillation - dehnt sich nicht über die volle Knorpeldicke aus
Es bestehen keine losen Lappen oder Knorpelstücke
- Typ VI) Knorpeldegradierung - degenerierter, weicher Knorpel, Typ IV und V kommen gemeinsam vor

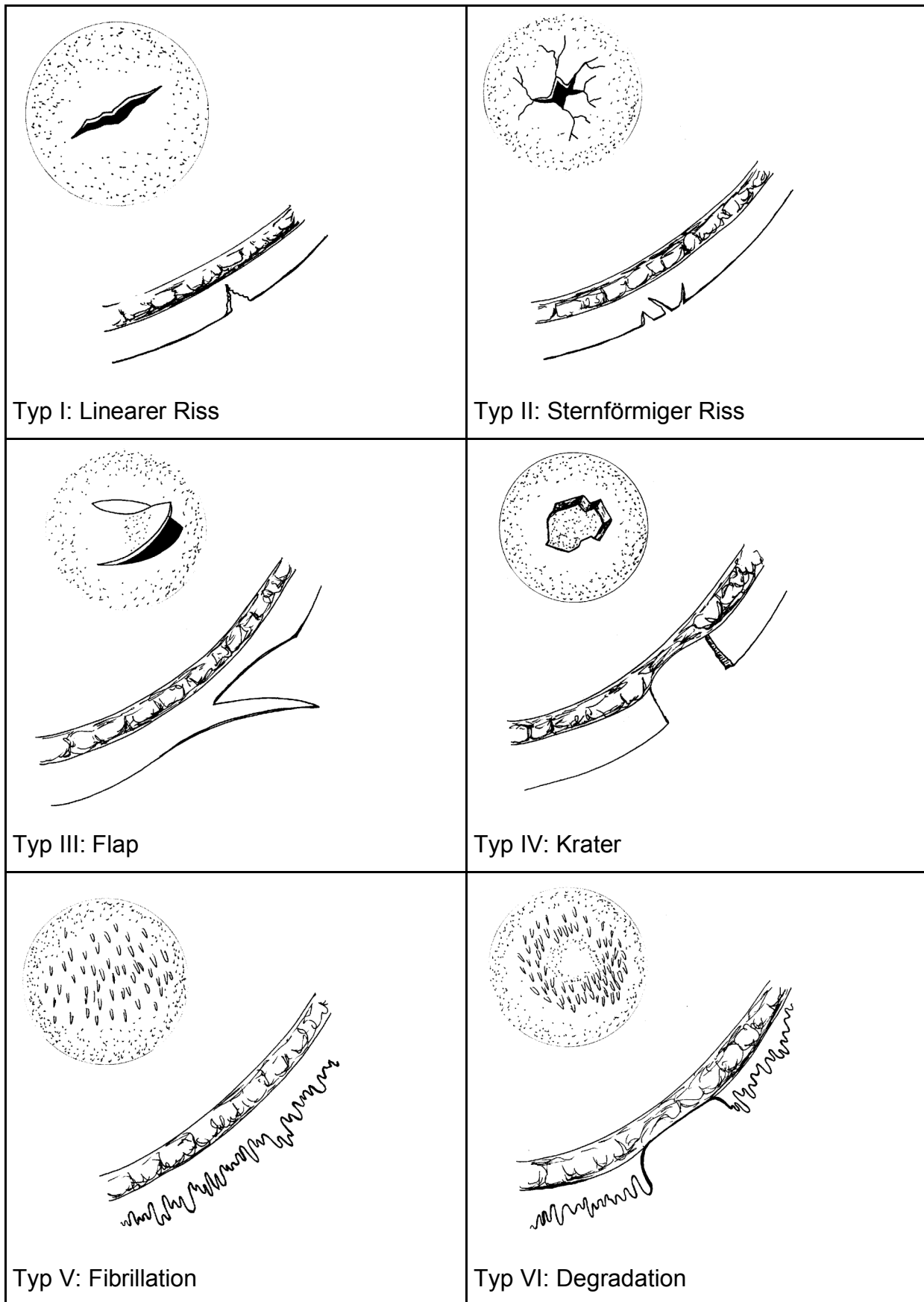


Abbildung 17: Klassifizierung nach Bauer

Gradierung nach Outerbridge:

Die Gradierung wurde leicht modifiziert übernommen (siehe Tab. 2).

Grad	Makroskopische Veränderungen
0	normaler Knorpel
1	weich und geschwollen
2	oberflächige Erosion oder Fissurierung / Lappen nicht bis zum subchondralen Knochen
3	tiefe Erosion oder Fissurierung / Lappen bis zum subchondralen Knochen
4	Knorpelglätze (exponierter subchondraler Knochen)

Tabelle 2: Gradierung nach Outerbridge

3.7.2 Konventionelle Histologie

Die 4 pro Hüftseite entnommenen Gelenkstücke verblieben 7 Tage lang in 4 % Formalin. Anschliessend wurden die Proben 4 x 20 min. gewässert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50/70/80/90/96/100 % Ethanol) während je 2 x 12 Stunden entwässert. Daraufhin wurden die Probenstücke 4 Tage lang in Xylol unter Vakuum entfettet. Die Flüssigkeit wurde 1 x nach einem Tag gewechselt. Diese Schritte fanden bei Raumtemperatur statt. Das Xylol wurde weggegossen und die Proben während einer Woche mit Methylmetacrylat bei 4°C unter Vakuum infiltriert. Die Herstellung des Methylmetacrylates erfolgte nach folgendem Schema:

Methacrylsäure-methylester (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz), Dibutylphthalat (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland) und Perkadox 16 (Dr. Grogg Chemie AG, Stetten, Schweiz) wurden im Verhältnis 89.5 : 10 : 0.5 gemischt und 10 min. mit dem Magnetrührer gerührt.

Danach wurden die Proben in luftdichte Teflonformen gelegt, mit Methylmetacrylat übergossen und im Wasserbad bei 28°C bis zur vollständigen Aushärtung belassen. Mit Leica Historesin Mounting Medium® wurden Plastikrahmen auf die harten Proben geklebt und als Blöcke aus den Formen gehoben. Nach der Beschriftung waren die Probenblöcke schnittbereit. Aus einem Block wurden je ein Dickschnitt und 4 Dünnschnitte hergestellt. Die Dickschnitte wurden mit einer Präzisionsinnenlochsäge (Leica® SP 1600, Leica Instruments GmbH, Deutschland) mit 300 µm Dicke gesägt. Die Schnittebene entsprach der Probenentnahmerichtung. Diese Dickschnitte wurden mit entionisiertem Wasser gereinigt, mit Alkohol entfettet und auf mit Alkoholspülung vorbereiteten Acrylglasplatten (Perspex GS 3 mm, Wachendorf AG, Technische Industrieprodukte, Basel, Schweiz) aufgeklebt (Klebstoff: Cementit® CA 12, Merz + Benteli AG, Niederwangen, Schweiz). Anschliessend wurden diese Schnitte mit einer Schleif- und Poliermaschine (Planopol-V 401, Struers A/S, Rodovre, Dänemark) auf eine Dicke von ca. 40 µm geschliffen und der Oberflächenfärbung mit Toluidin-Blau O unterzogen (Färbemethode siehe Anhang I). Damit waren die Dickschnitte bereit für die histomorphologische Untersuchung.

Die vier Dünnschnitte wurden mit einem Mikrotom (Leica® RM 2155, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) in einer Dicke von 5 µm hergestellt. Je ein Schnitt wurde mit Toluidin-Blau O bzw. mit van Kossa-/McNeal Tetrachrom-Färbung gefärbt (Färbemethode siehe Anhang I und II) und zwei Schnitte dienten ungefärbt als Reserve.

3.7.2.1 Probenuntersuchung und -auswertung nach Mankin

Sämtliche mit Toluidin-Blau O gefärbten Schnittpräparate wurden mit einem Lichtmikroskop (Leica® DMR, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) untersucht. Die Untersuchung der Schnitte erfolgte nach einem fixen Schema:

Der Objektträger mit dem Schnittpräparat wurde makroskopisch begutachtet, um grob den Zustand des Knorpels zu beurteilen und um die Sektoren im Präparat festzulegen. Da sich die Hauptveränderungen am Acetabulum innerhalb des Lunarknorpels vor allem in der Nähe des Labrums und in der Nähe der Fossa acetabuli befanden, wurden diese Stellen in zwei Zonen eingeteilt:

L = labral (gegen das Labrum hin)

C = central (gegen die Fossa hin)

Am Femurkopf wurden die Stellen lateral vom Lig. capitis ossis femoris und die Knorpelzunge auf Veränderungen untersucht. Diese Stellen wurden wie folgt bezeichnet:

C = central (gegen das Ligament hin)

P = peripher (gegen den Femurkopf/-halsübergang hin)

I = intermediär (die Strecke dazwischen)

Die Schnitte wurden zuerst mit der kleinsten und dann mit höherer Vergrößerung begutachtet. Mit der 100-fachen Vergrößerung wurden die Schnitte gemäss den Kriterien nach Mankin (siehe Tab. 3) in Grade eingeteilt und ausgewertet.

I	Struktur	Grad
	a. normal	0
	b. Oberfläche unregelmässig	1
	c. Pannus und Oberfläche unregelmässig	2
	d. Spalt bis in die Übergangsschicht	3
	e. Spalt bis in die Radiärschicht	4
	f. Spalt bis in die kalzifizierte Schicht	5
	g. totale Dysorganisation	6
II	Zellen	Grad
	a. normal	0
	b. diffuser Zellreichtum	1
	c. Clusters	2
	d. Zellarmut	3
III	Toluidin-Blau O-Färbung	Grad
	a. normal	0
	b. Färbung leicht reduziert	1
	c. Färbung mittelgradig reduziert	2
	d. Färbung stark reduziert	3
	e. keine Färbung sichtbar	4
IV	Integrität der Grenzlinie (Tidemark)	Grad
	a. intakt	0
	b. mit Blutgefässen durchbrochen	1

Tabelle 3: Histologisch-Histochemisches Grading nach H.J. Mankin

3.7.2.2 Probenuntersuchung und -auswertung mit van Kossa/McNeal-Färbung

Die Untersuchung wurde nach dem gleichen Schema wie bei der Probenauswertung nach Mankin durchgeführt. Mit der 100-fachen Vergrößerung wurden die erwähnten Sektoren lichtmikroskopisch (Leica® DMR, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) untersucht. Es wurde nach türkisefarbenen Stellen im subchondralen Knochen gesucht, diese pro Sichtfeld ausgezählt und addiert. Die Höhe der Summe pro Fläche wurde als quantitative Angabe für das Ausmass der Krankheit genommen. Dabei wurden 0 - 10 Stellen als geringe, ab 11 - 20 als mittlere und über 20 als hohe Anzahl eingestuft.

3.7.3 Immunhistochemie

Die dem Acetabulum-Sektor 7-9 und der Pars dorsalis am Femurkopf entnommenen, tiefgefrorenen Knorpelchips wurden 12 h in gepuffertem 4 % Formalin fixiert und nach den üblichen Methoden in schneidbare Paraffinblöckchen eingebettet. Von jedem Blöckchen wurden 10 Dünnschnitte mit 1-2 µm Dicke hergestellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger gelegt. Von den Präparaten wurde zur Fixierungs-, Färbestrukturkontrolle je ein Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

3.7.3.1 Probenuntersuchung und -auswertung von Kollagen II

Nachweis von Kollagen II-Überproduktion:

Im frühen Stadium einer Osteoarthritis wird von den Chondrozyten als letzter Rettungsversuch exzessiv Kollagen II synthetisiert und perizytär sezerniert.

Das Prinzip dieser immunhistochemischen Nachweismethode ist eine Zweischnitt-Färbetechnik. Sämtliche Knorpelpräparate wurden mit einem primären, monoklonalen Maus-Antikörper inkubiert, der unspezifisch an Epitope von Kollagen II band. Dann wurden die Präparate mit einem sekundären Antikörper inkubiert, der mit einem HRP-

markierten Polymer konjugiert war (Färbungsprotokoll siehe Anhang III). Nach Bindung des sekundären Antikörpers an den primären Antikörper waren die Stellen mit erhöhtem Kollagen II-Gehalt als zytoplasmatische und perichondrozytäre rote Flecken sichtbar. Die Matrix selber zeigte eine blassrosa bis rosa Farbe.

Da bis anhin für die vorliegende Auswertung kein passendes Gradierungssystem entwickelt worden ist, wurde wie folgt vorgegangen:

Die vorliegenden Schnitte wurden lichtmikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung (Leica® DMR, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) untersucht. Es wurde nach den typischen punktförmigen Anfärbungen gesucht und pro Sichtfeld ausgezählt, pro Fläche addiert und, wie unten dargestellt, eingeteilt.

- Grad 0: ≤ 5 Stellen
- Grad 1: 6 - 20 Stellen
- Grad 2: 21 - 40 Stellen
- Grad 3: > 40 Stellen

3.7.3.2 Probenuntersuchung und -auswertung von Kollagen II-Spaltprodukten

Nachweis von Kollagen II-Spaltprodukten:

Im weiteren Verlauf einer OA werden Kollagene von Proteinasen gespaltet und degradiert. Kollagenasen entspiralisieren und spalten die Tripelhelix und legen intra- α -Ketten Epitope frei, die mit spezifischen Antikörpern detektiert werden können. Zum Nachweis der Spaltstellen wurden beispielhafte Schnitte ausgewählt, die keine/mittlere/starke Anhäufung von Kollagen II-Synthese-Produkten aufwiesen.

Das Prinzip der Nachweismethode für Kollagen II-Spaltprodukte ist vergleichbar mit jenem für Kollagen II. Es wurden zwei Serien mit verschiedenen spezifischen primären Antikörpern inkubiert (Färbungsprotokoll siehe Anhang IV und V).

- mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern (COL 2 3/4C Short)
- mit monoklonalen Maus-Antikörpern (COL 2 3/4 M)

Die Schnitte wurden lichtmikroskopisch mit 100-facher Vergrößerung (Leica® DMR, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) untersucht. In der Matrix zeigten sich dunkelrot angefärbte Zellen, die pro Sichtfeld erfasst und pro Fläche addiert wurden. Die Matrix stellte sich je nach Gehalt der Spaltprodukte blassrosa bis rötlich dar. Da auch für diese Untersuchung kein praktikables Gradierungssystem gefunden werden konnte, wurden die gewonnenen Daten wie unten beschrieben semiquantitativ klassifiziert:

gefärbte Zellen in % aller Zellen:

- Grad 1: weniger als 25 %
- Grad 2: mehr als 25 % aber weniger als 50 %
- Grad 3: mehr als 50 % aber weniger als 75 %
- Grad 4: mehr als 75 %

Ausmass der Matrixfärbung:

- Grad 1: kaum Färbung, blassbläulich (HE-Hintergrund)
- Grad 2: blassrosa
- Grad 3: rosa, obere Knorpelschicht rötlich
- Grad 4: rötlich, obere Knorpelschicht rot

3.7.4 Auswertung der molekularen Marker bei Osteoarthritis

Die untenstehende Aufstellung zeigt, welche Stoffe mit quantitativer Real-Time PCR bzw. enzymatisch bestimmt wurden.

Quantitative Real-Time PCR — aus Knorpelgewebe:

- COX-2
- iNOS
- MMP-3

Enzymatische Bestimmung — aus Synovia:

- PGE₂
- NO

3.7.4.1 Quantitative Real-Time PCR

3.7.4.1.1 Messenger-RNA Isolierungs-Schritt

Es wurde die RNA-Isolierungsmethode nach Chomczynski [60] angewendet und nach Martin [61] modifiziert.

Die bei -20° C gelagerten und in Qiagen RNeasy Lysis Buffer™ (Qiagen AG, Basel, Schweiz) fixierten Knorpelchips aus Acetabulum-Sektor 7-9 wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach wurden sie auf einer gereinigten Oberfläche mit einem sterilen Skalpell zerkleinert und in Polypropylen-Röhrchen gebracht, welche mit 1 ml Tris Reagent™ (Sigma®, Saint Louis, USA) gefüllt waren. Die Röhrchen wurden für mind. 5 min. auf Eis gestellt. Tris Reagent lysiert die Zellen, gibt RNA, DNA und Proteine frei und schützt sie vor RNA-/DNAsen.

Die Röhrchen wurden einzeln in ein mit Eis gefülltes Gefäß gesetzt und mit dem Kinematica Polytron® Homogenisator (Brinkmann Instruments, Westbury, USA) während max. 1 min. durch Zerkleinern homogenisiert. Anschliessend wurde die

Mischung in grosse Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) umgegossen und für 5 min. bei Raumtemperatur belassen. Allen Eppendorf-Röhrchen wurden je 200 µl Trichlormethan beigegeben und 15 sec. mit dem oszillierenden Mischer Vortex® Genie 2 (Bender und Hobein, Zürich, Schweiz) gemischt. Trichlormethan teilt RNA, DNA und Proteine in drei Phasen, ist spezifisch schwerer und sinkt in der Lösung ab. Die Proben wurden ca. 15 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann für 15 min. bei 4° C und 12'000 RPM zentrifugiert. Dadurch wurde die Flüssigkeit in eine obere, farblose, RNA-haltige und eine untere rosafarbige Phase geteilt. Aus der oberen Phase wurden 600 µl in ein frisches Eppendorf-Röhrchen abpipettiert, mit dem gleichem Volumen 70 % Ethanol vermischt und sofort in die speziellen RNeasy Column Filtrationssäulen (RNeasy Kit, Qiagen AG, Basel, Schweiz) transferiert. Nach dem Filtrationsvorgang wurden diesen Proben gemäss dem Instruktionsblatt (RNeasy Mini Protocol for Isolation for Total RNA from Animal Tissues) nacheinander drei verschiedene Puffer und RNase-freies Wasser zugegeben und dazwischen jeweils 2 min. bei 12'000 RPM zentrifugiert. Die isolierte mRNA wurde in Eppendorf-Röhrchen bei -80° C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.7.4.1.2 cDNA Herstellungs-Schritt

Für die Umschreibung von mRNA in cDNA wurden Reagentien von Promega (Catalys AG, Wallisellen, Schweiz) bezogen und gemäss den Produkt-Angaben angewendet. Die Proben mit der isolierten RNA wurden aufgetaut, im ersten, dem DNase-Schritt je 7.5 µl Probe mit 2.5 µl der Lösung I (DNase Buffer, DNase und RNasin) vermischt und bei 37° C während 30 min. auf einem regulierbaren Heizblock inkubiert. Danach wurde 1 µl Stop-Lösung zugegeben und erneut für 10 min. bei 65° C inkubiert. Im zweiten Schritt, dem RT-Schritt, wurde in je 10 µl Probe 15.5 µl Lösung II (Magnesium Chlorid, RT-Buffer, dNTP's, rRNasin, AMV RT und Primer Random Hexamer) zugegeben, für 10 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschliessend bei 42° C für 60 min. inkubiert. Dann wurde die Temperatur für 5 min. auf 95° C erhöht und die Proben 5 min. auf Eis gebracht. Anschliessend wurden die Proben während 20 sec. bei 12'000 RPM zentrifugiert, mit DEPC Wasser auf 100 µl Totalvolumen verdünnt und bei -20° C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

3.7.4.1.3 Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Die PCR-Technik erlaubt das rasche Vervielfachen von DNA-Abschnitten. Während einem Zyklus werden die Doppel-DNA-Stränge durch Hitze denaturiert bzw. getrennt. Der Probe werden hitzestabile DNA-Polymerasen, entsprechende Primers (DNA-Stücke mit ca. 20 Basenpaaren) und komplementäre Nukleotide zugegeben. Diese Nukleotide binden an einen Einfach-DNA-Strang und ergänzen diesen zu einem Doppel-DNA-Strang. Dadurch werden in einem Zyklus aus einem DNA-Stück zwei DNA-Stücke amplifiziert.

Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR, bei der ein Endprodukt ausgewertet wird, kann bei der RT-PCR nach jedem Amplifikationszyklus eine Messung vollzogen werden. Der Probe werden bestimmte Nukleotid-Sequenzen als Sonde zugegeben. Dieses Nukleotid-Stück trägt am 3'-Ende einen reaktiven Fluoreszenzfarbstoff, den sogenannten Reporter. Das 5'-Ende ist mit einem Unterdrücker, dem sogenannten

Quencher, gekoppelt, der ebenfalls einen Farbstoff trägt. Diese markierten Sonden-Stücke binden an denaturierte DNA. Während dem PCR-Zyklus wird der Reporter durch die DNA-Polymerase vom Quencher getrennt. Durch diese Spaltung wird die Fluoreszenzfarbe des Reporters aktiviert und leuchtet. Je mehr DNA-Stränge vorhanden sind, umso mehr Fluoreszenz wird durch die Reporter emittiert. Nach jedem Zyklus wird das emittierte Licht im TagMan[®]-Analysator gemessen und als Exponentialkurve graphisch dargestellt. Je weniger Zyklen notwendig sind, um eine „Mindest-Fluoreszenz“ zu detektieren, desto mehr DNA lag in der ursprünglichen Probe vor.

Für die Bestimmung der synthetisierten cDNA wurden die aufgetauten Proben mit den in Tabelle: „Sequenz der verwendeten Primer und Sonden“ (siehe Tab. 4) aufgeführten Lösungen in speziellen Mikrotubes vermischt und in den TaqMan[®]-Analysator (ABI Prism[®] 7700 Sequence Detection System, Perkin Elmer Biosystems, Forster City, USA) eingesetzt. Bei allen Messungen wurden zwei Negativkontrollen durchgeführt, in denen anstelle von DNA nur DEPC-Wasser mit der Lösung vermischt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden aus der gewonnenen cDNA der Gehalt von COX-2, iNOS, MMP-3 (Stromelysin) und GAPDH quantitativ bestimmt. GAPDH ist ein Enzym, welches in allen Zellen konstitutiv produziert wird und dessen DNA-Sequenz seit langem bekannt ist. Deshalb eignet es sich als interne Kontrolle.

Die verwendeten Reagentien wurden von Microsynth, Balgach, Schweiz, bezogen.

Code		Sequence 5'.....3'
oGAPDH	.461f	TGG GCT TGA ACC ACG AG
	.585r	AGT CCC TCC ACG ATG CCA
	.489p	ATA CCC TCA AGA TTG TCA GCA ATG CCT CCT
oMMP3	(.48f)	TTA AAG GAA ATC AGT TCT GGG CC
	.49f	TAA AGG AAA TCA GTT CTG GC
	.129r	GAA GGC CCA GGG TAT GGA T
	.77p	AGG CAA TGA GAT GCA AGC AGG TTA CCC
oiNOS	.282f	TGA CTT TCC AAG ACA CGC TTC A
	.373r	ACT TTT TGG GAT TCA TGA TGG ATG
	.306p	AGA AGG CCA AAG GGG ATC TCT CCT GCA
oCOX2	.71f	CAT GCC AGA ATC GAG GTG TAT GTA
	.211r	CGG GAG TGG GTT TCA GGA GT
	.150p	TGA AAA CTG TAC CAC ACC TGA ATT TCT GAC AAG A

Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden

3.7.4.2 Enzymatische Bestimmung

Für die weitere Bearbeitung wurden die dafür vorgesehenen Proben aufgetaut.

3.7.4.2.1 Prostaglandin E₂-Bestimmung

PGE₂ wurde mittels eines „Competitive Enzyme Immunoassay-Kit“ quantitativ bestimmt. Die Analysemethode erfolgte gemäss den Instruktionen des Herstellers (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, England). Um die Ergebnisse zu optimieren, wurden die Proben im Doppelversuch angesetzt. Das Prinzip dieser Nachweismethode basierte auf einer kompetitiven Bindungstechnik. Das Test-Kit enthielt eine Mikrotiterplatte, die mit Ziegen-Antimäus-Antikörpern beschichtet war. Das zu messende PGE₂ konkurrierte um die Bindungsstellen an monoklonalen Maus-Antikörpern mit einer definierten Menge PGE₂-Substrat, die mit alkalischer Phosphatase gekennzeichnet war.

Während der Inkubationszeit wurden die Maus-Antikörper an die in den Mikrotubes fixierten Ziegen-Antimäus-Antikörper gebunden. Ungebundenes Substrat wurde in mehreren Waschvorgängen entfernt. Die gebundene Menge PGE₂ konnte ermittelt werden, indem die Dichte mit einem Mikroplattenlesegerät (Micoplate Reader, Dyntech Products AG, Schweiz) bei 405 nm / Wellenlänge 570 nm photometrisch gemessen wurde.

3.7.4.2.2 Stickstoffmonoxid-Bestimmung

Das Analyseprinzip beruht auf einer enzymatischen Umwandlung von Nitrat zu Nitrit durch das Enzym Nitratreductase. Für die Bestimmung des Stickstoffmonoxid-Gehalts wurde das Reaktions-Endprodukt Nitrit gemessen, das nach der Griess Reaktion als azogefärbtes Produkt in sichtbarem Licht bei 540 – 570 nm absorbiert und spektrophotometrisch im Mikroplattenlesegerät (Micoplate Reader, Dyntech Products AG, Schweiz) gemessen werden kann. Das gemessene Nitrit entspricht 51.5 ± 3.5 % des produzierten NO in einer Zelle. Die Analysemethode des Stickstoffmonoxid-Gehalts erfolgte standardmässig gemäss den Hersteller-Angaben des „Total Nitric Oxide Assay“ (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, England).

4 RESULTATE

4.1 Operation

Sämtliche Operationen verliefen komplikationsfrei. Alle Schafe hatten die Anästhesie gut überstanden, waren nach ca. 2-3 Stunden wieder vollständig wach und frassen. In der Zeit zwischen Operation und Schlachtung war bei keinem Schaf eine Komplikation aufgetreten.

4.2 Radiologie

Die Qualität aller Röntgenbilder war gut. Es ist jedoch nicht in allen Fällen gelungen, die Hüfte und die Winkelung der Beine immer in genau gleicher Stellung darzustellen.

4.3 Makroskopische Auswertung

4.3.1 Deskriptive Auswertung

Die folgenden Tabellen und Diagramme zeigen die Veränderungen des **operierten Hüftgelenks**, welche rein deskriptiv aufgrund der Beobachtungen während der Schlachtung, anhand der Fotos, Zeichnungen und Notizen vorgefunden wurden. Auf die nichtoperierten Hüftseiten wurde bei dieser Auswertung nicht weiter eingegangen, sie diente lediglich zur internen Kontrolle der einzelnen Tiere.

4.3.1.1 Vergleich der Schäden der Acetabulum-Sektoren 7-9 / 12-2 / 4-6

1. Labrumschäden

2. Veränderungen Übergang Labrum/Knorpel

3. Knorpelschäden

In diesem Kapitel entspricht die Zahl im Tabellenfeld der Anzahl Schafe von insgesamt 16 Schafen, bei welchen die jeweilige Veränderung gefunden wurde. Gleiches gilt für die Diagramme.

1. Labrumschäden

Labrum	Ac 7-9	Ac 12-2	Ac 4-6
normal	2	16	15
Rötung / Längsriss	7	0	1
Auffasserung/ Einriss	6	0	0
Degeneration	1	0	0

Tabelle 5: Deskriptive Auswertung Labrumveränderungen

Tabelle 5 zeigt, dass im Acetabulum-Sektor 7-9 in 14 von 16 Fällen ein verändertes Labrum vorhanden war. In den Acetabulum-Sektoren 12-2 und 4-6 gab es nur eine einzige Labrumveränderung (Bildbeispiele siehe Abb. 18).

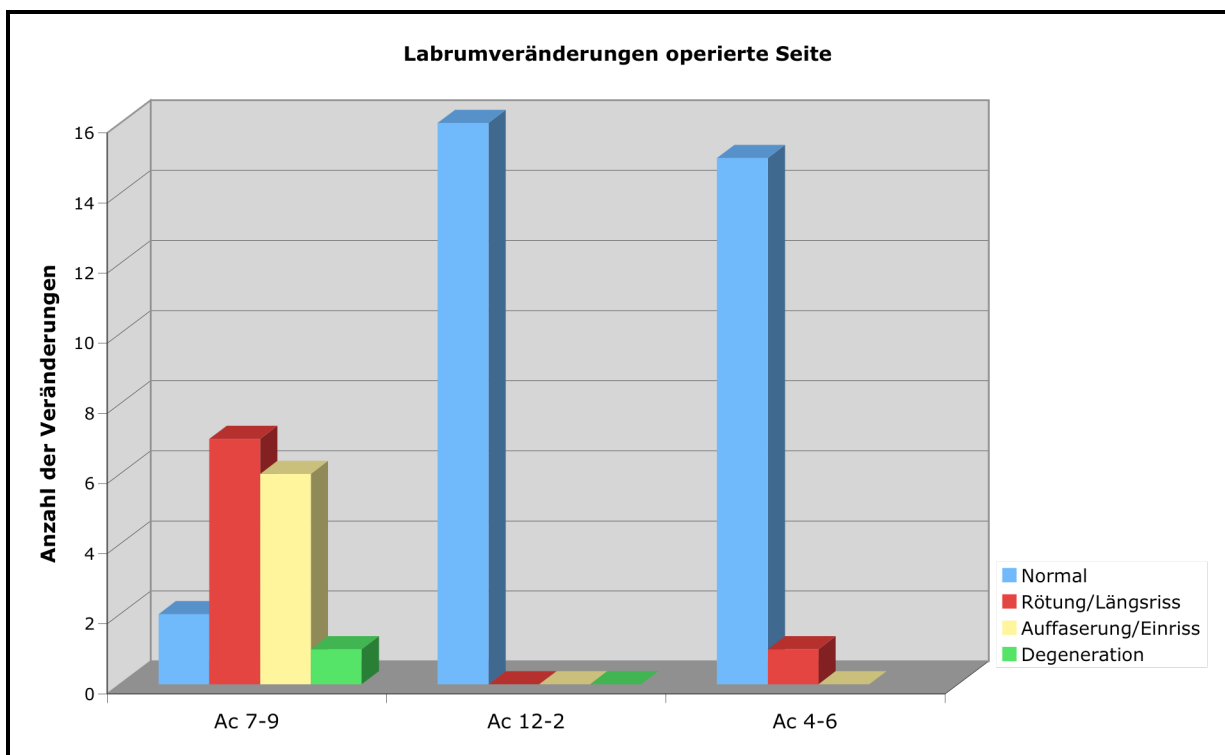


Diagramm 1: Graph. Darstellung deskriptive Auswertung Labrumveränderungen

2. Veränderungen Übergang Labrum/Knorpel

Übergang Labrum / Knorpel	Ac 7-9	Ac 12-2	Ac 4-6
normal	0	16	16
„Teppichphänomen“	7	0	0
Längsriss/ Auffaserung	9	0	0

Tabelle 6: Deskriptive Auswertung Veränderungen Übergang Knorpel/Labrum

Die Tabelle 6 zeigt, dass im Acetabulum-Sektor 7-9 kein Labrum/Knorpel-Übergang ungeschädigt war. Dafür wurden „Teppichphänomene“ und Längsrisse bzw. Auffaserungen an der Übergangsstruktur gefunden. In den Übergangsstrukturen der Acetabulum-Sektoren 12-2 und 4-6 wurden keine Schäden festgestellt (Bildbeispiele siehe Abb. 19).

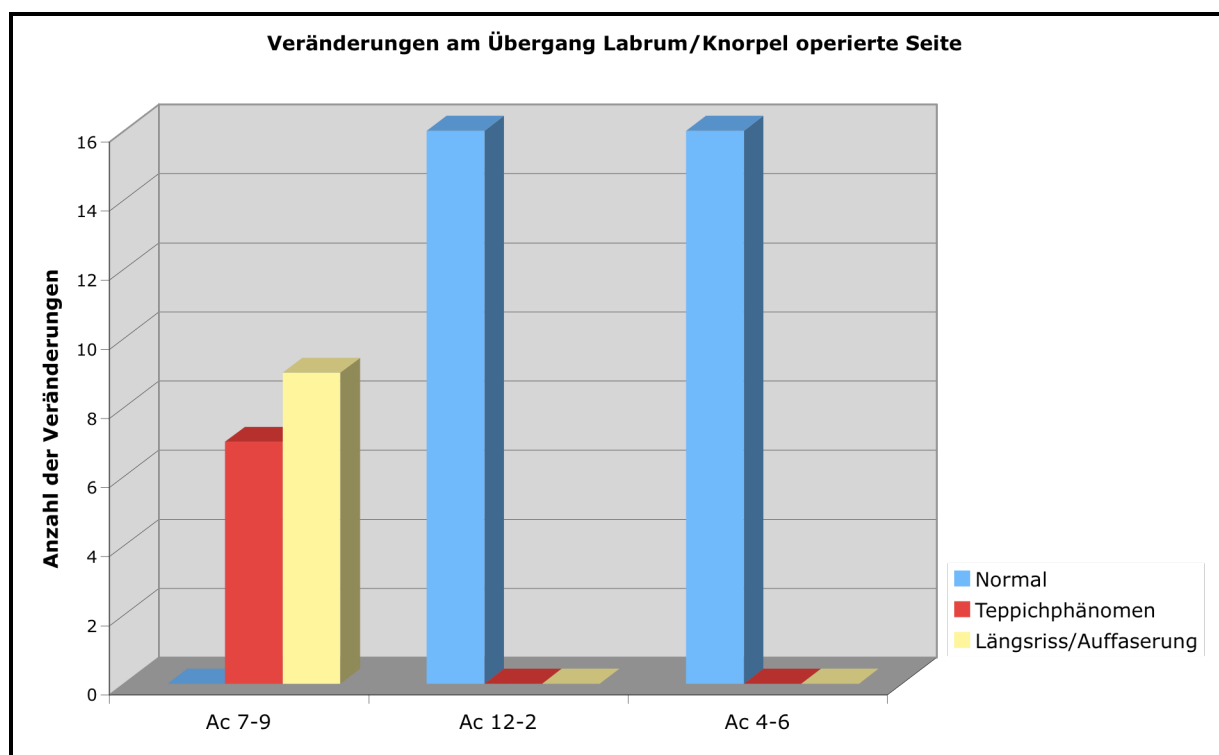


Diagramm 2: Graph. Darstellung deskriptive Auswertung Übergang Knorpel/Labrum

Die Tabellen (5 und 6) und Diagramme (1 und 2) zeigen deutlich, dass das Labrum und der Labrum/Knorpel-Übergang nur im Acetabulum-Sektor 7-9 geschädigt wurden.

3. Knorpelschäden

Knorpel	Ac 7-9	Ac 12-2	Ac 4-6
Normal	1	16	11
Rötung/ Ausdünnung	1	0	0
Aufrauhung	11	0	4
Einrisse	2	0	0
Flap	2	0	0
Abrasion	2	0	1

Tabelle 7: Deskriptive Auswertung Knorpelveränderungen

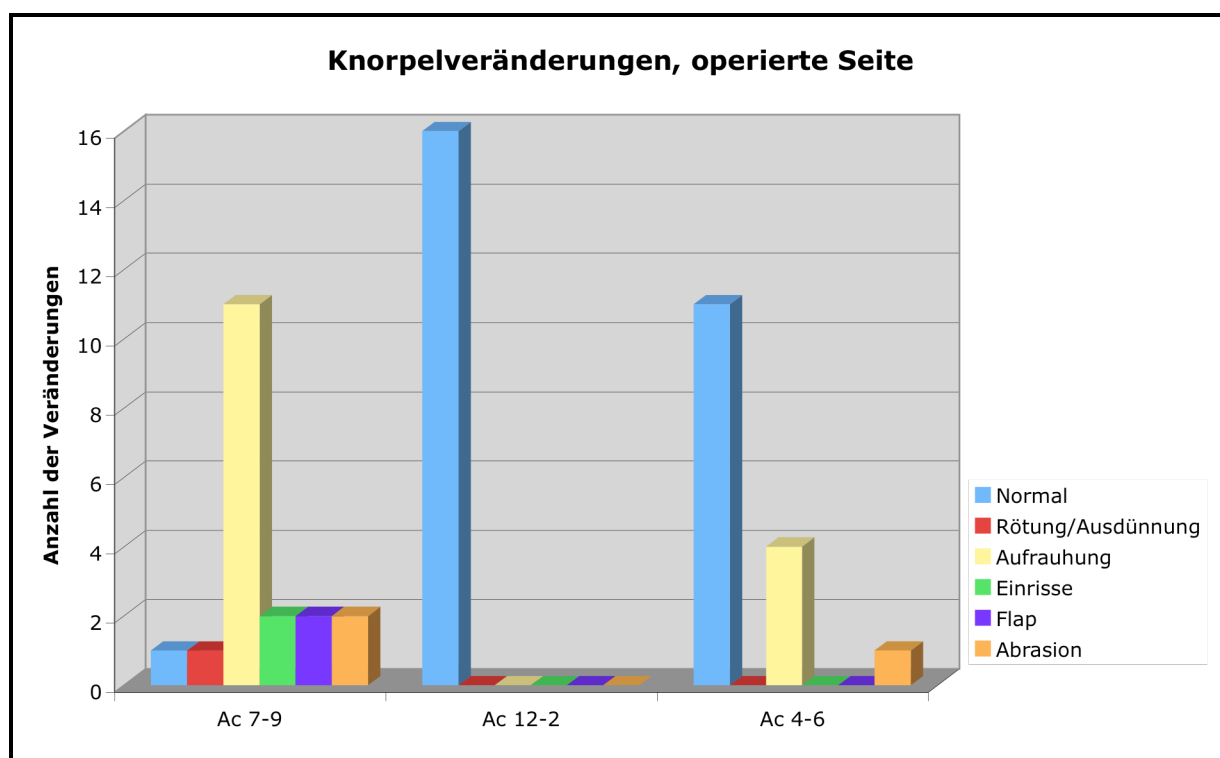


Diagramm 3: Graph. Darstellung deskriptive Auswertung Knorpelveränderungen

In der Tabelle 7 und im Diagramm 3 zeigt sich erneut die starke Veränderung im Acetabulum-Sektor 7-9 mit vermehrt pathologischen Veränderungen des Knorpels.

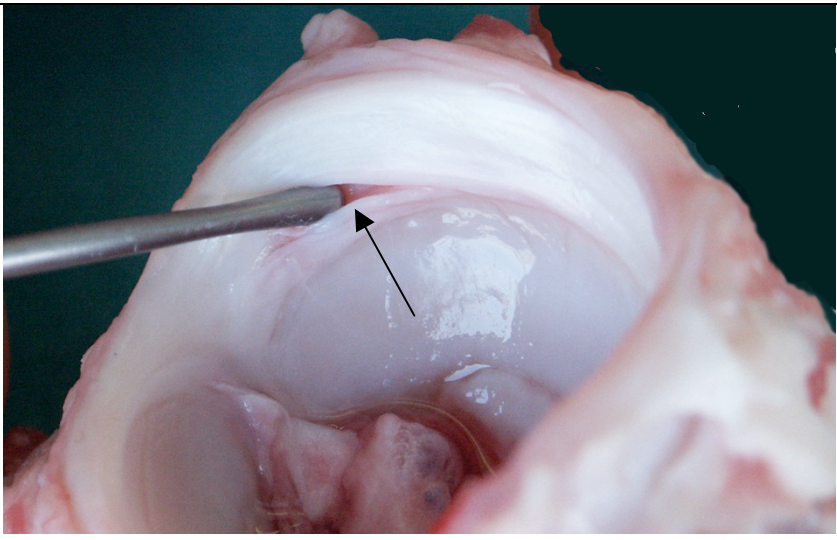
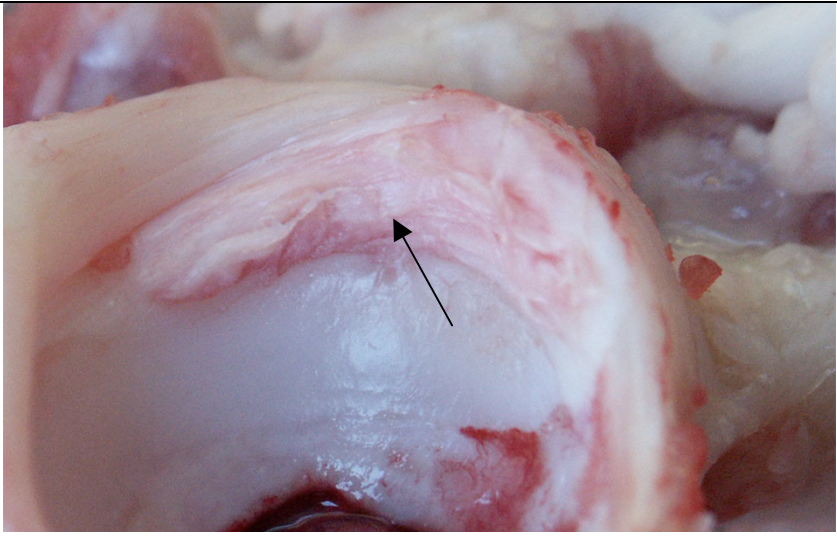
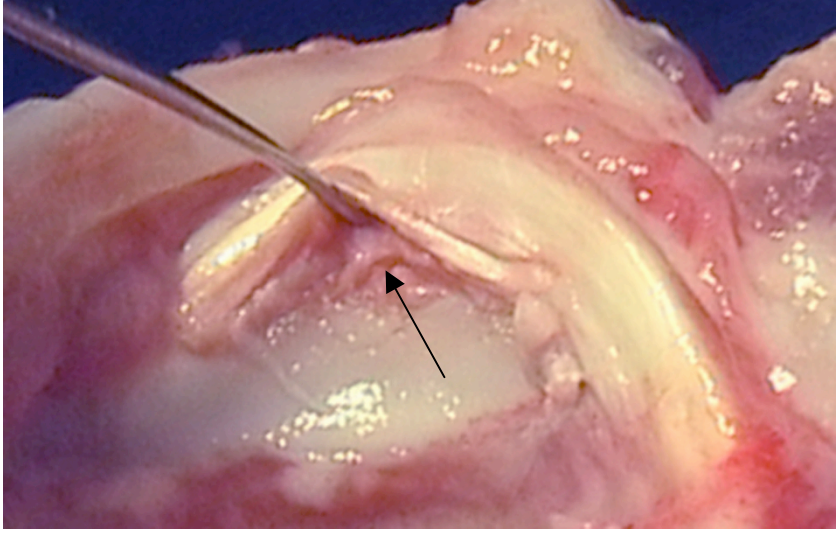
	Labrumriss 1 Schaf 1017 Ac 7-9 rechts
	Auffaserung des Labrums 2 Schaf 1015 Ac 7-9 links
	Degeneration des Labrums 3 Schaf 1009 Ac 7-9 links

Abbildung 18: Makroskopisch sichtbare Labrumveränderungen


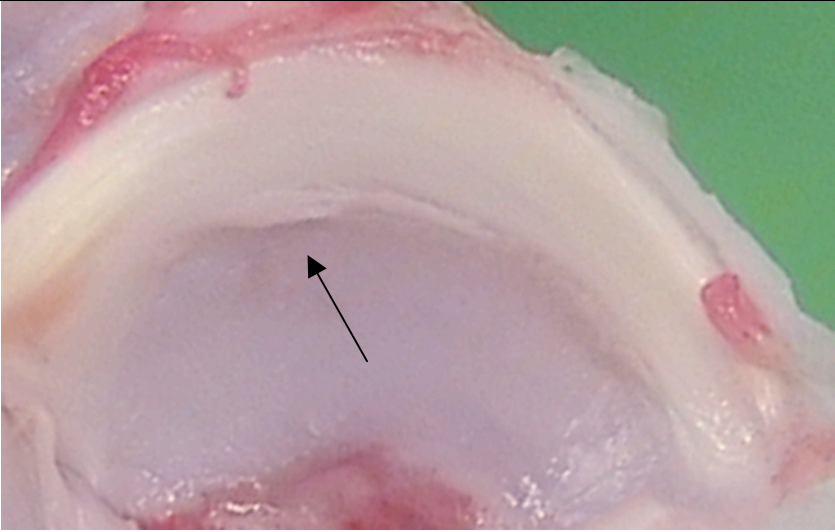
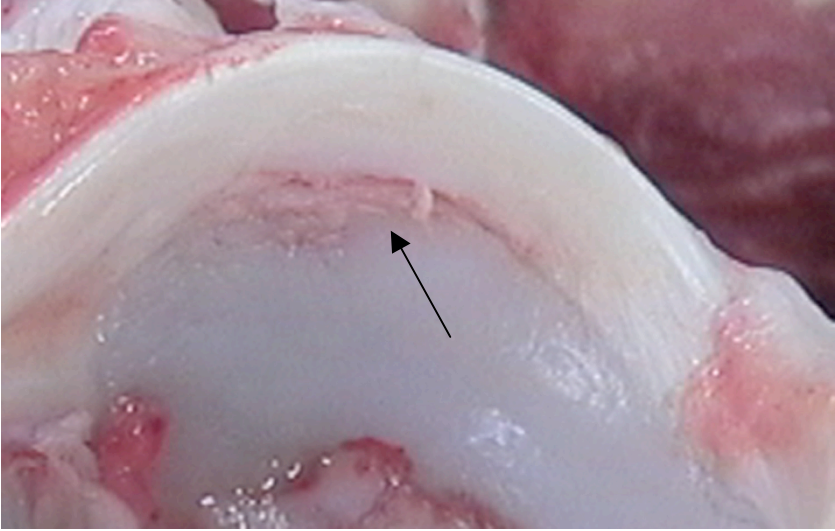
	Normaler Übergang 1 Schaf 1017 Ac 7-9 links
	„Teppichphänomen“ 2 Schaf 1006 Ac 7-9 rechts
	Längsrisse/ Auffaserungen 3 Schaf 1005 Ac 7-9 rechts

Abbildung 19: Makroskopisch sichtbare Veränderungen Übergang Labrum/Knorpel

4.3.1.2 Vergleich der Schäden Acetabulum-Sektor 7-9 im zeitlichen Verlauf

1. Labrumschäden

2. Veränderungen Übergang Labrum/Knorpel

3. Knorpelveränderungen

Die folgenden Diagramme zeigen, wie sich die Ausprägung der Schäden im Acetabulum-Sektor 7-9 der operierten Hüftseite bei längerer Laufzeit änderte.

Die Zahlen pro Gruppe (14 / 22 / 30 / 38 Wochen) beziehen sich auf je 4 Schafe. Pro Schaf können mehrere Veränderungen nebeneinander auftreten.

1. Labrumschäden Acetabulum-Sektor 7-9

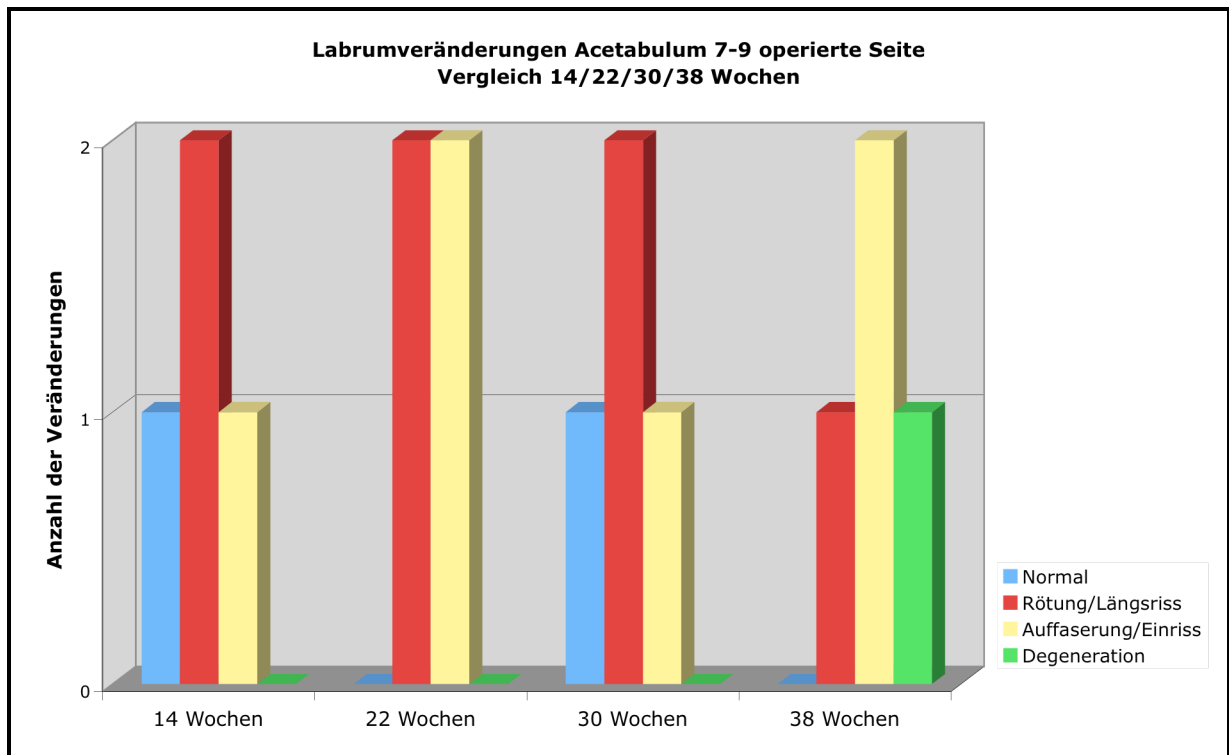


Diagramm 4: Deskriptive Auswertung Labrumveränderungen nach Zeit

Im zeitlichen Verlauf konnte keine lineare Verschlimmerung der Schäden festgestellt werden. Das Diagramm 4 zeigt aber, dass nach 38 Wochen kein Labrum mehr normal war, und die stärkste Veränderung, eine Degeneration, auftrat.

2. Veränderungen Übergang Labrum/Knorpel Acetabulum-Sektor 7-9

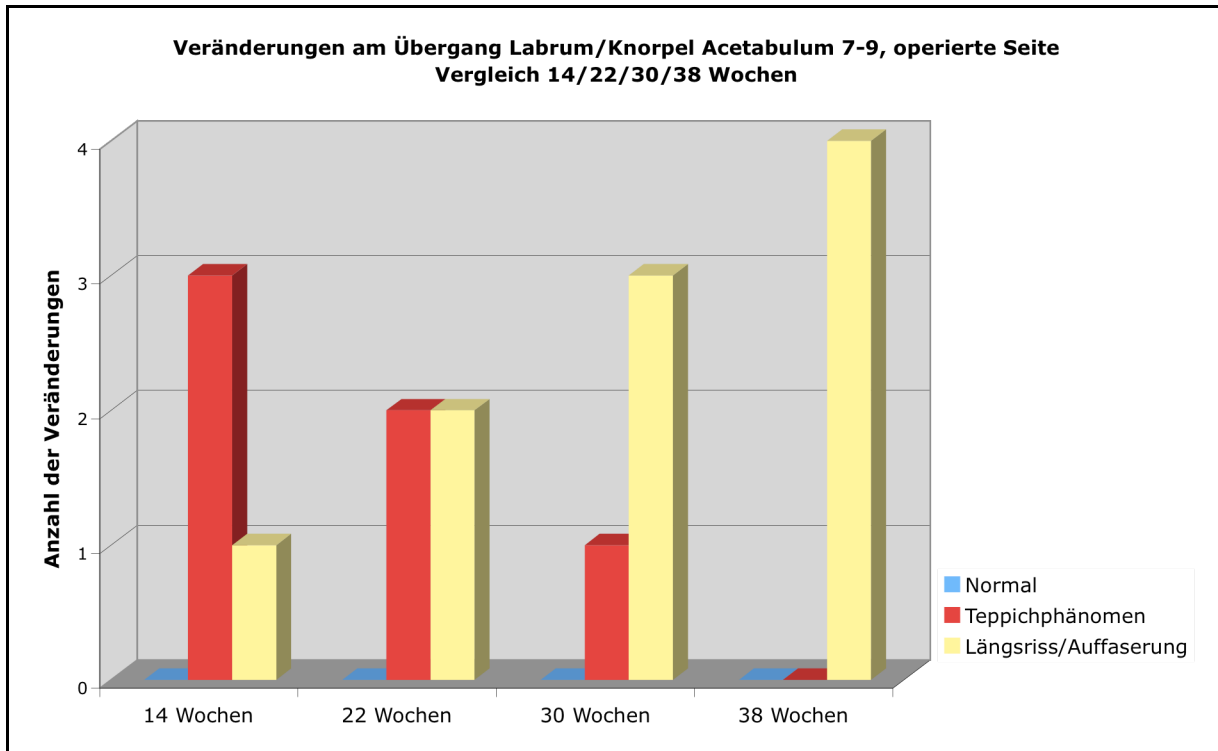


Diagramm 5: Deskriptive Auswertung Übergang Labrum/Knorpel nach Zeit

Das Diagramm 5 zeigt mit linearem Verlauf, wie im frühen Stadium das „Teppichphänomen“ vorherrschte, welches sich im späteren Verlauf zu Längsrissen und Auffaserungen verschlimmerte.

3. Knorpelveränderungen Acetabulum-Sektor 7-9

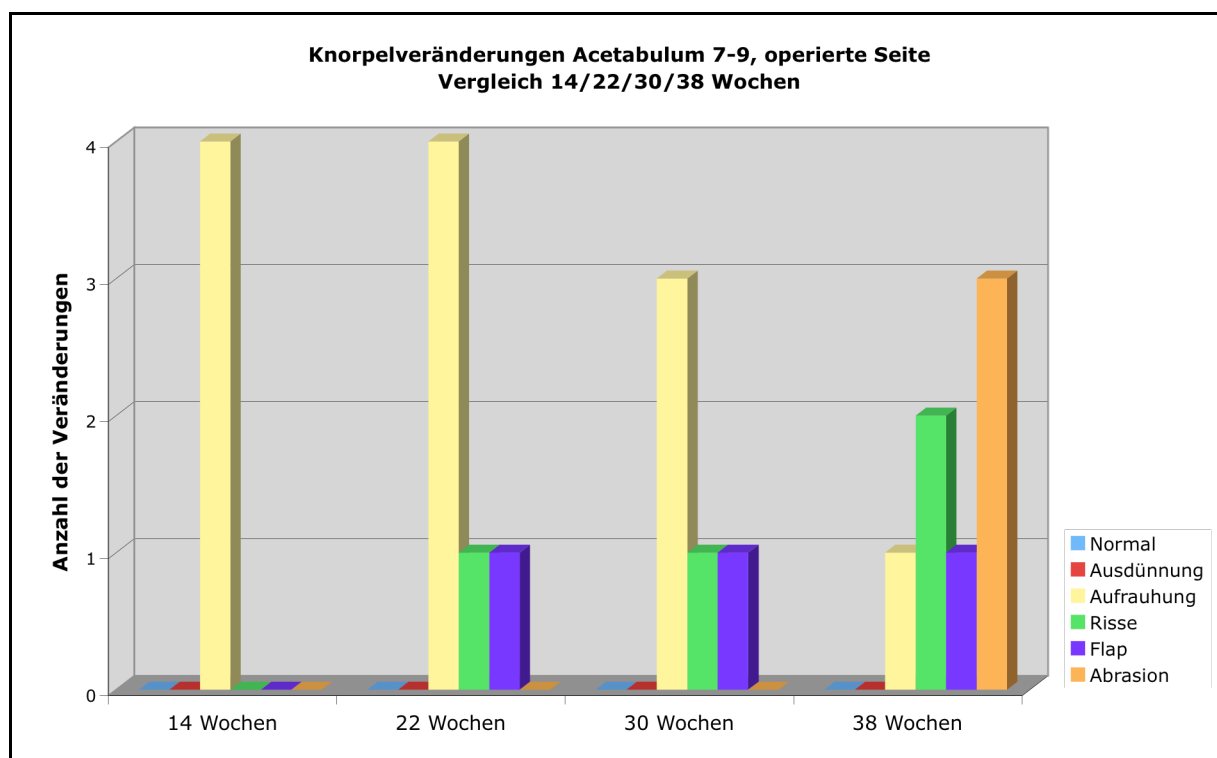


Diagramm 6: Deskriptive Auswertung Knorpelveränderungen nach Zeit

Das Diagramm 6 zeigt, dass bereits nach 14 Wochen im Acetabulum-Sektor 7-9 der Knorpel bei keiner operierten Hüfte mehr normal war, in allen Fällen aber nur Aufrauhungen auftraten. Mit längerer Laufzeit nahmen leichte Veränderungen ab, dafür wurden häufiger stärkere Schäden, wie Einrisse und Flaps gefunden. Nach 38 Wochen zeigten sich sogar sehr starke Veränderungen, wie Knorpelglatzen (Abrasion).

4.3.1.3 Vergleich der Schäden am Femurkopf und Halsübergang

Die untenstehenden Tabellen zeigen, wie viele von insgesamt 16 Schafen eine gewisse Veränderung an der operierten Seite am Femurkopf (central und intermediär) bzw. Femurkopf/-halsübergang (peripher) aufwiesen. Pro Stelle wurde jeweils nur eine Veränderungsart gefunden (Bildbeispiele siehe Abb. 20)

Femurkopf	central	intermediär
normal	5	8
Rötung/ Ausdünnung	5	5
Auffaserung	3	2
Abrasion	3	1

Tabelle 8: Deskriptive Auswertung Veränderungen Femurkopf

Die Tabelle 8 zeigt, dass die Hauptschäden am operierten Femurkopf im zentralen Bereich lagen. An dieser Stelle zeigten nur 5 von 16 Schafen normalen Knorpel.

Femurkopf/-halsübergang	Sattelbildung
normal	0
mild	8
mittel	3
stark	5

Tabelle 9: Deskriptive Auswertung Veränderungen Femurkopf/-halsübergang

Die Tabelle 9 zeigt, dass an sämtlichen operierten Hüften am Übergang vom Femurkopf zum Femurhals eine sattelähnliche Ausbildung stattgefunden hat.

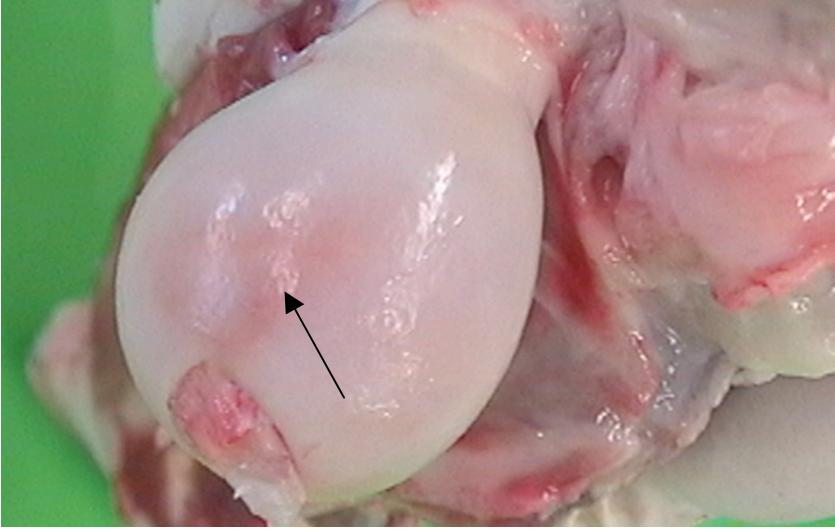
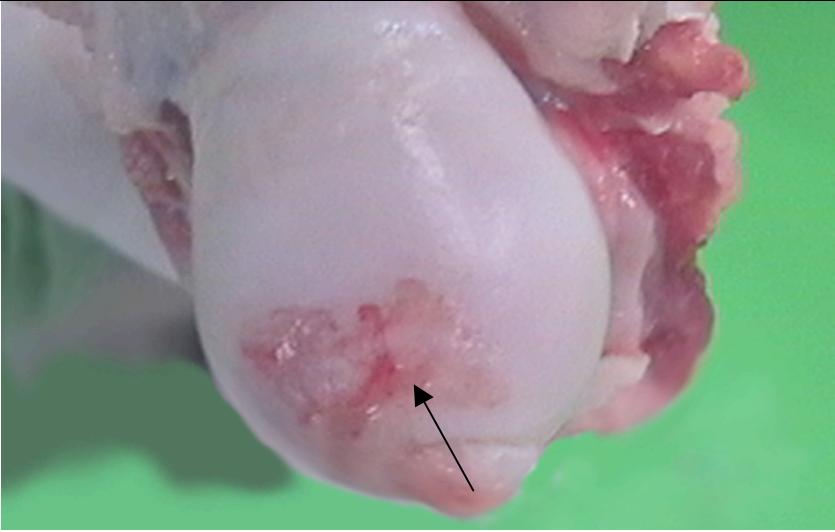
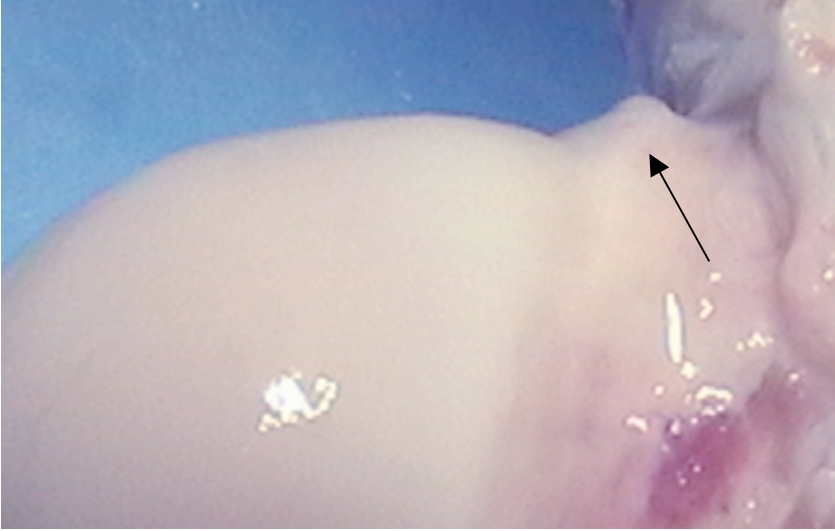
	Rötung/Ausdünnung 1 Schaf 1008 Femurkopf rechts
	Abrasion 2 Schaf 1006 Femurkopf rechts
	Sattelbildung 3 Schaf 1012 Femurkopf/-halsübergang links

Abbildung 20: Makroskopisch sichtbare Veränderungen Femurkopf + Halsübergang

4.3.2 Auswertung der Klassifizierung nach Bauer

Wie im Kapitel „Literatur“ erwähnt, hat Bauer versucht, die Läsionen mit den verursachenden Kräften in Verbindung zu bringen [34]. Beim Impingement-Mechanismus werden Scherkräfte auf die beteiligten Strukturen ausgeübt. Unten sind nochmals die 6 Typen aufgelistet. Die fett gedruckten Typen sind durch Scherkräfte entstanden.

- **Typ I) linearer Riss, vorwiegend aus Scherkräften resultierend**
- Typ II) sternförmiger Riss, tritt nach Schlägen und Rotationskräften auf
- Typ III) Flap oder Lappen, durch Einklemmung der Gelenkstrukturen entstanden
- **Typ IV) Krater, meist durch Scherkräfte entstanden**
- **Typ V) Fibrillation, repräsentiert frühe Phase der degenerativen Arthrose**
- **Typ VI) Degeneration, lokalisierte Arthrose in der gewichttragenden Zone (IV und V gemeinsam)**

Die folgende Tabelle 10 zeigt die Veränderungen der operierten Hüftseite im Vergleich zur nichtoperierten Kontrollseite. Die Zahl pro Feld entspricht der Anzahl der Schafe, bezogen auf die Totalanzahl der Schafe (16 Tiere), welche eine bestimmte Veränderung aufwiesen. Bei dieser Klassifizierung können mehrere Veränderungen nebeneinander vorkommen, daher wurde das Total aller Veränderungen pro Sektor auch aufgeführt, um zu verdeutlichen, welcher Sektor generell am stärksten betroffen war.

Veränderungen (x/16)	Ac 7-9		Ac 12-2		Ac 4-6	
Acetabulum	Op	Co	Op	Co	Op	Co
Riss	9	2	2	1	3	0
Stern	3	0	0	0	0	0
Flap	3	0	0	0	0	0
Krater	1	1	0	1	0	0
Fibrillation	7	5	2	1	5	0
Degeneration	6	0	0	0	0	0
Total Veränderungen	29	8	4	3	8	0

Veränderungen (x/16)	FK central		FK-H peripher	
Femurkopf + Halsübergang (c + p)	Op	Co	Op	Co
Riss	0	0	0	0
Stern	0	0	0	0
Flap	0	0	0	0
Krater	3	0	1	0
Fibrillation	7	0	12	0
Degeneration	2	0	1	0
Total Veränderungen	12	0	14	0

Tabelle 10: Auswertung der Veränderungen nach Bauer

An der operierten Seite im Acetabulum-Sektor 7-9 wurden 23 von 29 Schäden vom Typ I, IV, V, VI gefunden, die gemäss Bauer durch Scherkräfte verursacht werden. Nur 6 von 29 Veränderungen wurden festgestellt, die durch Schläge/Rotation bzw. Einklemmung (Typ II, III) verursacht wurden. Die Sektoren 12-2 und 4-6 und alle 3 Acetabulum-Sektoren der nichtoperierten Seite zeigten ebenfalls die durch Scherkräfte verursachten Schäden, aber wesentlich seltener.

Am operierten Femurkopf (central) bzw. Femurkopf/-halsübergang (peripher) wurden ausschliesslich durch Scherkräfte verursachte Schäden gefunden. Im Gegensatz zum Acetabulum, wurden nur die Typen IV, V und VI festgestellt. Der nichtoperierte Femurkopf wies in keinem Fall einen nach Bauer klassifizierbaren Schaden auf.

Diese Klassifizierung zeigte eindeutig, dass der Sektor 7-9 am stärksten geschädigt war.

Die deskriptive Auswertung und die Auswertung nach Bauer wurden nicht statistisch analysiert, da es sich bei den gewonnenen Zahlen um qualitative Daten handelt, die mit aufsteigendem Grad nicht zwingend mit einer Verstärkung der Krankheit gleichzusetzen sind.

4.3.3 Auswertung der Gradierung nach Outerbridge

1. Aufschlüsselung operierte Seite versus Kontrollseite

2. Aufschlüsselung nach Zeit

Mit der Gradierung nach Outerbridge konnten makroskopische Veränderungen erfasst werden. Die Werte steigen mit zunehmendem Schweregrad und wurden statistisch analysiert.

1. Aufschlüsselung operierte Seite versus Kontrollseite

In der untenstehenden Tabelle 11 sind die Mittelwerte der Outerbridge-Grade von 0 bis 4 der operierten Seite im Vergleich zur Kontrollseite aufgeführt.

Stelle	Operierte Seite (Op)	Kontrollseite (Co)
Acetabulum gesamt	1.06	0.23
Sektor 7-9	2.63	0.44
Sektor 12-2	0.19	0.25
Sektor 4-6	0.38	0.00
Femurkopf+Halsübergang (c + p)	1.75	0.06
Femurkopf central	1.69	0.00
Femurkopf/-halsübergang peripher	1.81	0.13

Tabelle 11: Auswertung der Veränderungen nach Outerbridge

Die Tabelle 11 zeigt beim Acetabulum gesamt und beim Femurkopf ein höchst signifikanter Unterschied zwischen operierter Seite und Kontrollseite ($p = 0.0001$).

Die meisten und stärksten Veränderungen befanden sich fast ausschliesslich im Acetabulum-Sektor 7-9 ($p = 0.0001$).

Keine signifikanten Unterschiede wurden in den Acetabulum-Sektoren 12-2 ($p = 0.77$) und 4-6 ($p = 0.54$) festgestellt.

Die höchste Signifikanz ergaben die Unterschiede am Femurkopf gesamt, zentral und peripher ($p = 0.0001$).

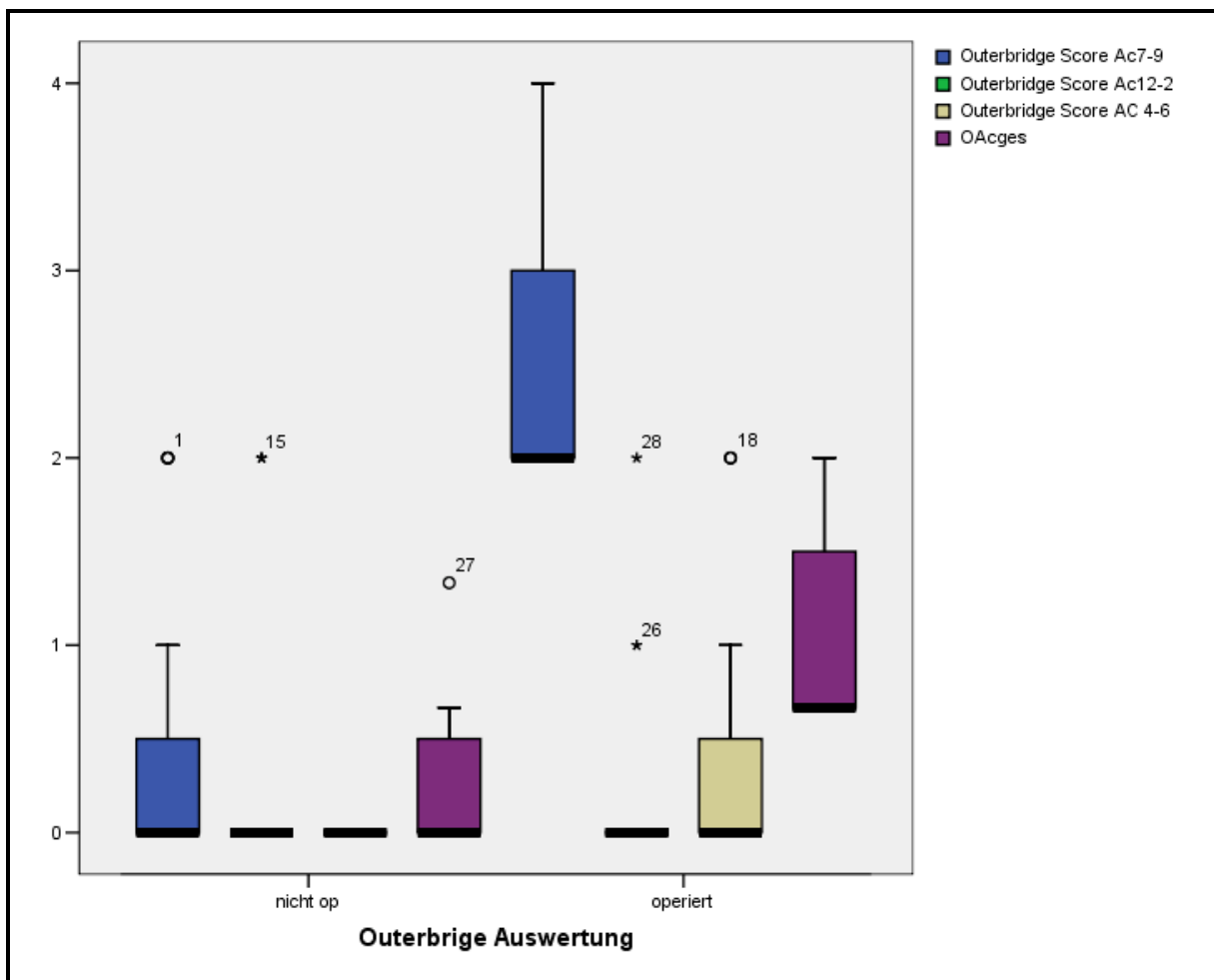


Diagramm 7: Boxplot der Auswertung nach Outerbridge

Im Boxplot-Diagramm 7 zeigen sich erneut im Acetabulum-Sektor 7-9 (blau) und insgesamt im Vergleich operiert versus nichtoperiert (lila) statistisch signifikante Veränderungen.

2. Aufschlüsselung nach Zeit

Im Zeitverlauf zwischen den Gruppen mit verlängerter Laufzeit konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

Erst zwischen der kürzesten Laufzeit von 14 Wochen (Mittelwert 2.0) und der längsten Laufzeit 38 Wochen (Mittelwert 3.25) ergab sich eine minimale Signifikanz ($p = 0.04$).

4.4 Histologische Auswertung

4.4.1 Auswertung der Gradierung nach Mankin

1. Aufschlüsselung operierte Seite versus Kontrollseite

2. Aufschlüsselung nach Zonen

3. Aufschlüsselung nach Zeit

Mit der Gradierung nach Mankin konnten die histologisch erkennbaren Veränderungen erfasst und statistisch analysiert werden.

1. Aufschlüsselung operierte Seite versus Kontrollseite

Die untenstehende Tabelle 12 zeigt die Mittelwerte der Mankin-Grade (MG).

Stelle	Operierte Seite (Op)	Kontrollseite (Co)
Acetabulum gesamt	4.88	0.91
Sektor 7-9	5.72	0.97
Sektor 12-2	3.88	1.25
Sektor 4-6	5.03	0.05
Femurkopf+Halsübergang (c + i + p)	5.44	0.35
Femurkopf (central + intermediär)	3.65	0.44
Femurkopf/-halsübergang (peripher)	9	0.44

Tabelle 12: Auswertung nach Mankin, operierte Seite versus Kontrollseite

Der Tabelle 12 ist zu entnehmen, dass die Mittelwerte der Mankin-Grade der operierten Hüfte höchst signifikant grösser gegenüber der nichtoperierten Kontrollseite waren ($p = 0.0001$).

Die Veränderungen am Acetabulum waren stärker als am Femurkopf (Mittelwert MG 4.88 versus 3.65). Die stärksten Veränderungen zeigten sich peripher am Übergang zum Femurhals (Mittelwert MG 9), entsprechend der makroskopisch beobachteten Sattelbildung.

Am operierten Acetabulum zeigten die Sektoren 7-9 die grössten histologischen Veränderungen (Mittelwert MG 5.72), die mit den Befunden der makroskopischen Auswertung korrelierten.

Im Sektor 4-6 (Mittelwert MG 5.03) wurden annähernd gleich hohe Werte gefunden.

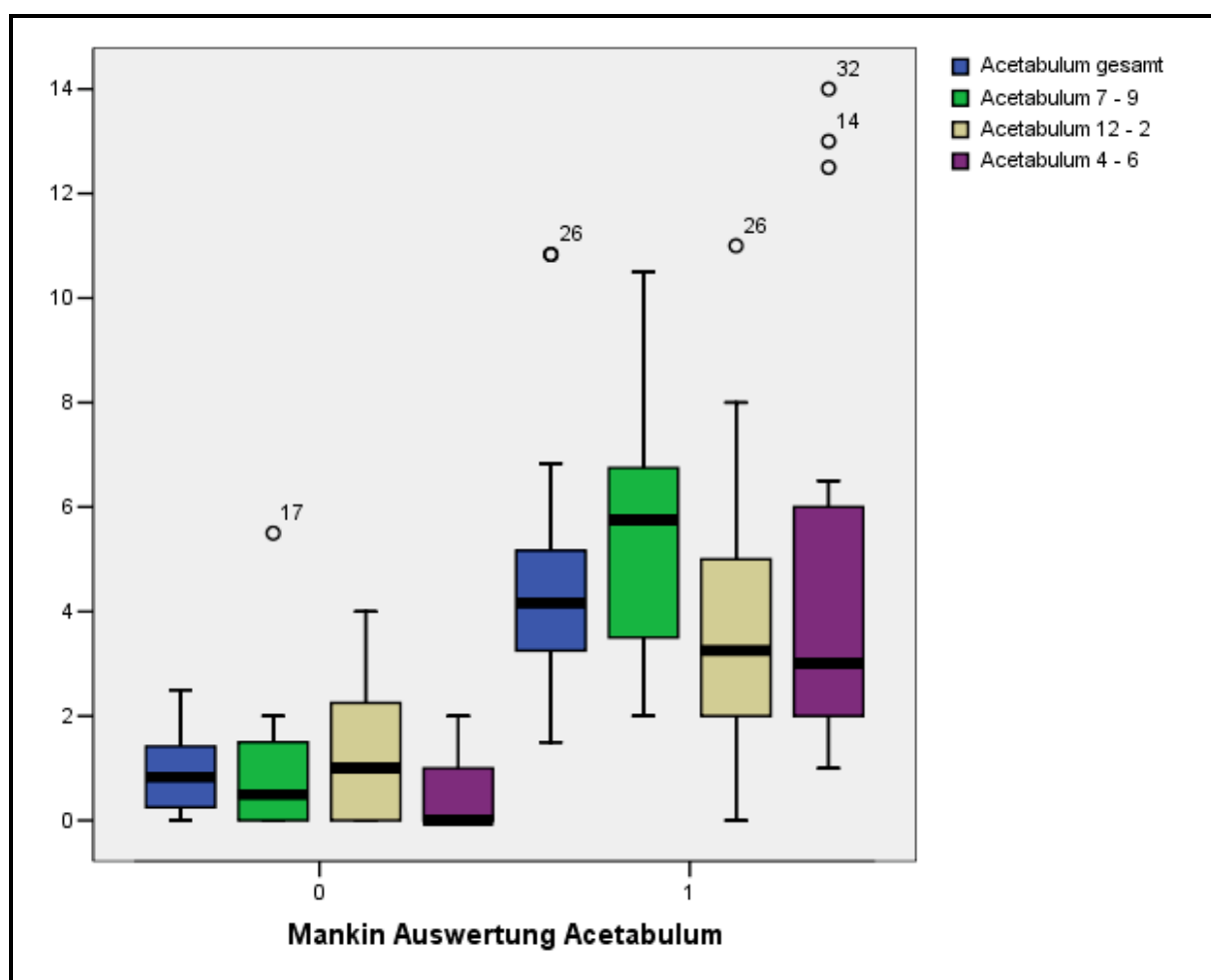


Diagramm 8: Boxplot der Auswertung nach Mankin, Acetabulum

Die Boxplot-Darstellung 8 zeigt die histologischen Veränderungen im Acetabulum-Sektor 7-9 im Vergleich zu den Acetabulum-Sektoren 12-2 und 4-6 mit statistischer Signifikanz ($p = 0.04$).

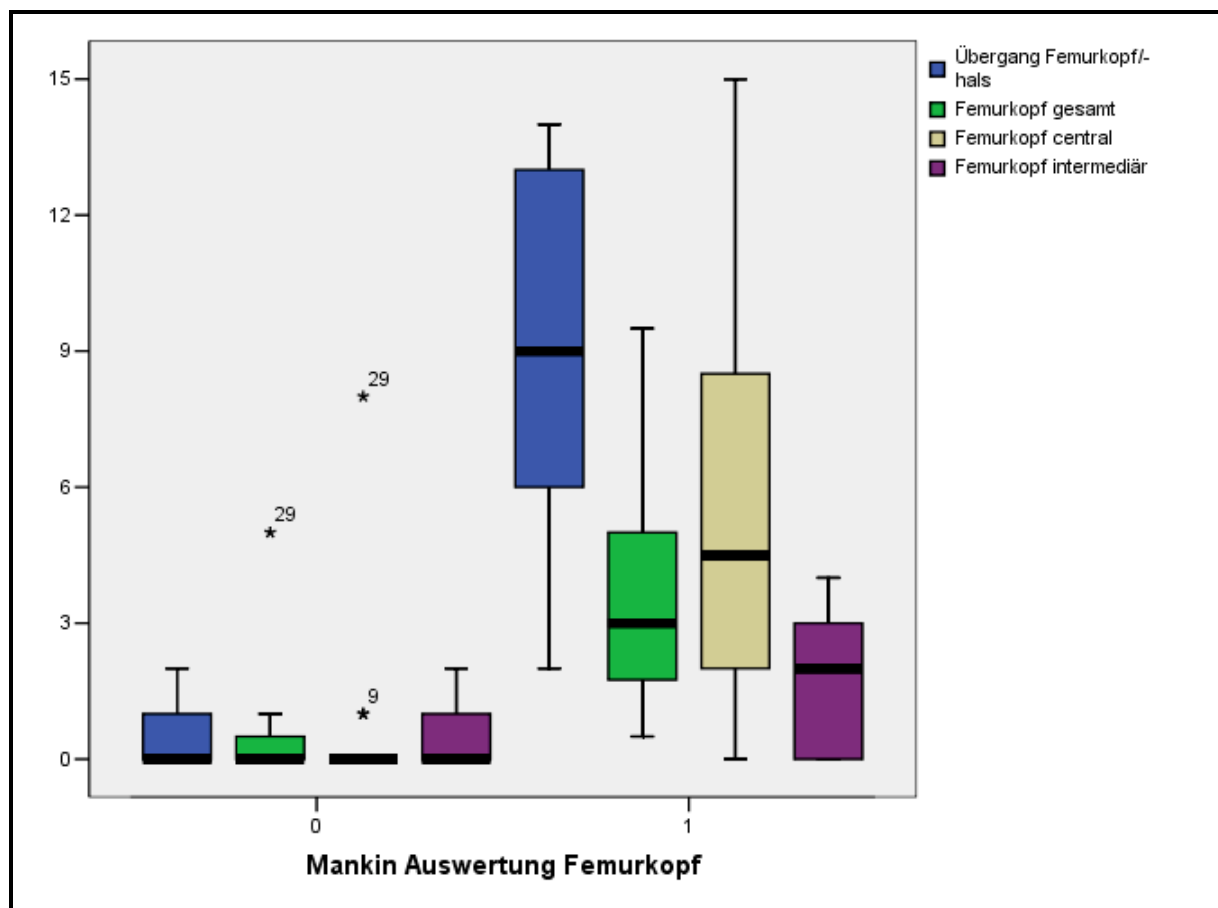


Diagramm 9: Boxplot der Auswertung nach Mankin, Femurkopf

Die obige Boxplot-Darstellung 9 zeigt die signifikanten Veränderungen am Femurkopf im Vergleich zur Kontrollseite ($p = 0.0001$), und signifikante Veränderungen am Femurkopf/-halsübergang ($p = 0.0001$).

Am Übergang Femurkopf zum Femurhals wurden sattelähnliche Zubildungen festgestellt.

Die Veränderungen am Femurkopf waren signifikant im zentralen Bereich, ohne osteoarthritische Knorpelveränderung ($MG < 3$) im intermediären Bereich.

2. Aufschlüsselung nach Zonen

Die untenstehende Tabelle 13 zeigt den Vergleich der Mankin-Grad-Mittelwerte mit Aufschlüsselung nach den einzelnen Zonen.

Stellen	Zonen operierte Seite		Zonen Kontrollseite	
	labral	central	labral	central
Acetabulum				
Sektor 7-9	7.62	3.81	1.88	0.06
Sektor 12-2	5.00	2.75	2.19	0.31
Sektor 4-6	6.00	4.06	0.56	0.44
Femurkopf	intermediär	central	intermediär	central
	1.63	5.69	0.25	0.63

Tabelle 13: Vergleich Mankin-Grade nach Zonen

Der Tabelle 13 ist zu entnehmen, dass sich die stärksten histologischen Veränderungen am Acetabulum im Sektor 7-9 in der labralen Zone und am Femurkopf in der zentralen Zone befanden. Die labrumnahen Veränderungen am Acetabulum im Sektor 7-9 entsprechen der postulierten Zone des Impingement-Mechanismus.

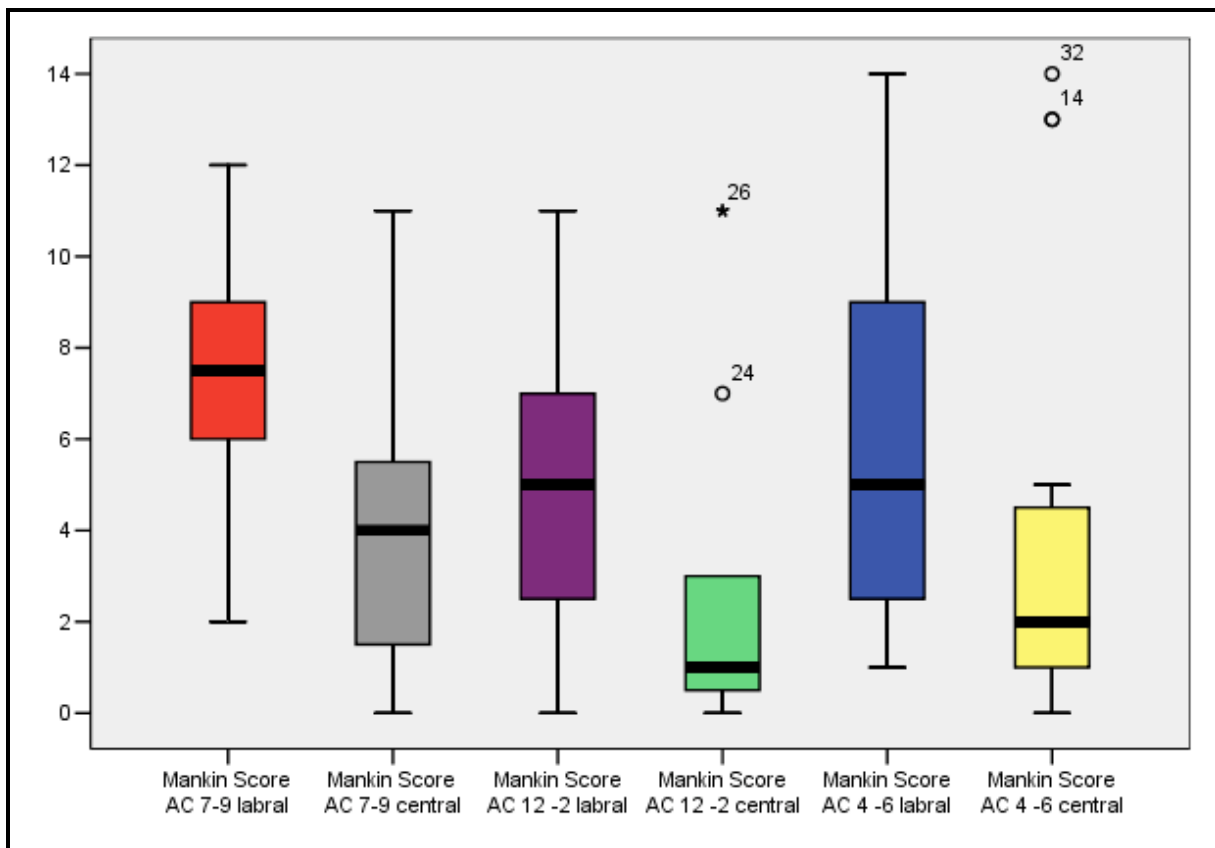


Diagramm 10: Boxplot der Mankin-Grade nach Zonen, Acetabulum

Dem obigen Boxplot-Diagramm 10 ist für **die operierte Seite** eine Signifikanz in Bezug auf Ac 7-9 labral gegenüber central zu entnehmen ($p = 0.04$)

Insgesamt zeigt sich, dass die Veränderungen am Acetabulum labrumnah (labral) stärker ausgeprägt sind, als zur Fossa (central) hin.

3. Aufschlüsselung nach Zeit

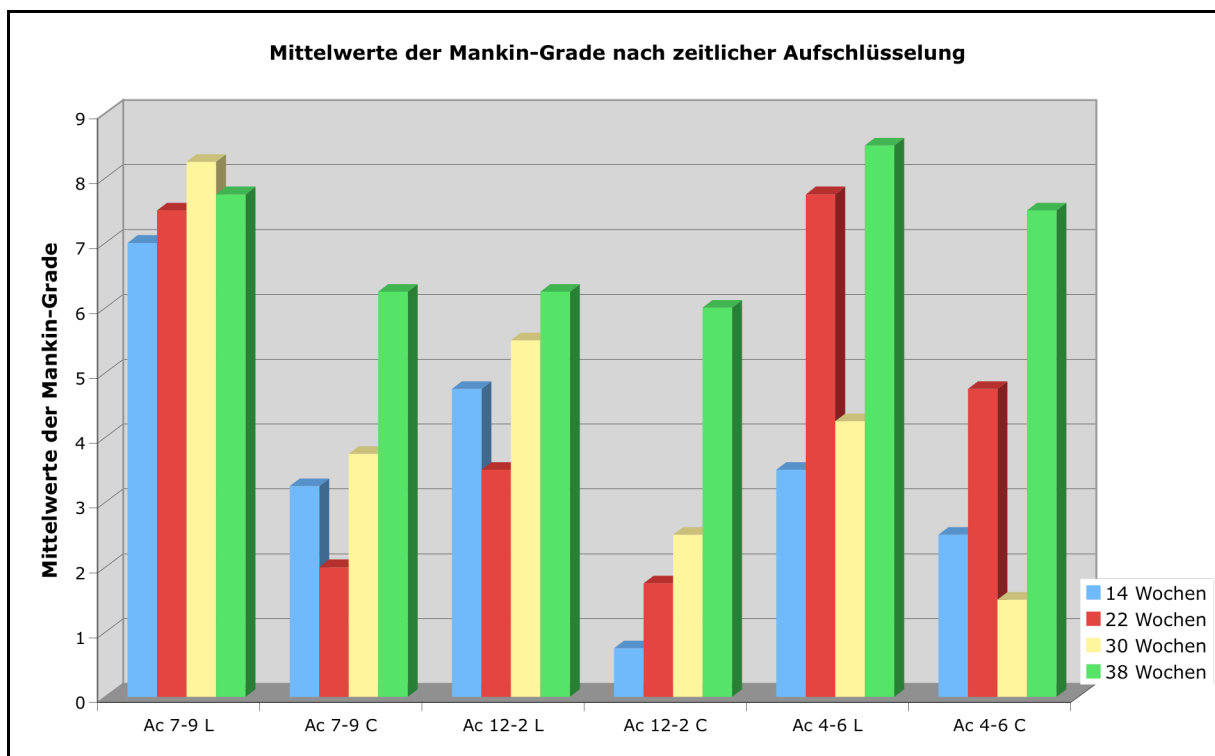


Diagramm 11: Vergleich der Mankin-Grade nach Zeit, Acetabulum ²

Das Diagramm 11 zeigt, dass am Acetabulum / Sektor 7-9 / labrale Zone ab 14 bis 30 Wochen Laufdauer die Mittelwerte der Mankin-Grade doppelt so hoch waren, wie die der zentralen Zone.

Nach 38 Wochen Laufdauer sind die MG's der zentralen Zone fast gleich hoch, wie die der labralen Zone.

Bis 30 Wochen Laufdauer sind die MG's im Sektor 7-9 L doppelt bis dreimal so hoch, wie in den restlichen Sektoren.

Nach 38 Wochen sind die MG's aller Sektoren annähernd gleich hoch.

² L = labral / C = central

Diese Aussagen gelten für Acetabulum und Femurkopf:

- Sämtliche Mankin-Grade (MG) auf der operierten Seite waren signifikant höher als auf der Kontrollseite.
- Mit längerer Laufdauer stiegen die MG's.
- Nach 38 Wochen Laufzeit stieg der Durchschnitts-MG am Femurkopf über 11, das Acetabulum erreichte Werte zwischen 8 und 10.

Diese Aussagen gelten für das operierte Acetabulum:

- Ab 14 bis 30 Wochen Laufdauer waren die labralen Mankin-Grade meist doppelt so hoch, wie die zentralen.
- Nach 38 Wochen Laufdauer waren die labralen MG's fast gleich hoch, wie die zentralen.
- Bis 30 Wochen Laufdauer waren die labralen MG's im Sektor 7-9 doppelt bis dreimal so hoch, wie in den restlichen Sektoren.
- Nach 38 Wochen waren die MG's aller Sektoren annähernd gleich hoch.

Diese Aussagen gelten für den operierten Femurkopf:

- Nach 14 Wochen Laufdauer wurden peripher und zentral bereits Durchschnitts-Mankin-Grade von 6 festgestellt.
- Nach 22 Wochen Laufdauer stieg der Durchschnitts-MG peripher bereits auf 10.
- Nach 38 Wochen Laufdauer stieg der Durchschnitts-MG zentral verzögert auch auf 10.
- Intermediär waren keine nennenswerte Veränderungen festgestellt worden.

Diese Aussagen gelten für das nichtoperierte Acetabulum:

- Mehr als 3/4 der Sektoren wiesen den MG 0 auf.
- Der durchschnittliche MG pro Gruppe stieg nicht über 3.
- Die labralen MG's waren höher als die centralen.

Diese Aussagen gelten für den nichtoperierten Femurkopf:

- Mehr als 3/4 der Stellen wiesen den MG 0 auf.
- Der durchschnittliche MG pro Gruppe stieg nicht über 2.

Zusammenfassung der Auswertung nach Mankin:

- Die operierte Seite war stark geschädigt, die nichtoperierte kaum.
- Die Impingement-Sektoren 7-9 waren auf der operierten Seite schon sehr früh geschädigt.
- Die anderen Sektoren der operierten Seite entwickelten verzögert auch Schäden.
- Generell war am Acetabulum die labrale Zone früher und stärker betroffen als die zentrale, die jedoch verzögert auch starke Veränderungen entwickelte.
- Die stärksten Veränderungen wurden am Acetabulum-Sektor 7-9 (MG 5.72) und am Femurkopf/-halsübergang (MG 9) gefunden, also an den Stellen, wo Impingement durch die Varisation erwartet wurde.

4.4.2 Auswertung mit van Kossa-/McNeal Tetrachrom-Färbung

1. Aufschlüsselung operierte Seite versus Kontrollseite

2. Aufschlüsselung nach Zonen

3. Aufschlüsselung nach Zeit

Mit der van Kossa-/McNeal Tetrachrom-Färbung konnten die knöchernen An- bzw. Umbaureaktionen im subchondralen Knochen erfasst und statistisch analysiert werden.

1. Aufschlüsselung operierte Seite versus Kontrollseite

Die untenstehende Tabelle 14 zeigt die Auswertung der operierten Seite im Vergleich zur Kontrollseite für Acetabulum, Femurkopf und Femurkopf/-halsübergang mit der van Kossa-/McNeal Tetrachrom-Färbung. Wie im Kapitel 3.7.2.2 beschrieben bedeuten die Zahlen in den Tabellen die Summe der erwähnten Stellen pro ausgezählte Fläche.

Stelle	Operierte Seite	Kontrollseite
Acetabulum gesamt	17.71	7.35
Sektor 7-9	16.59	6.61
Sektor 12-2	15.03	6.86
Sektor 4-6	21.50	9.03
Femurkopf (central + intermediär)	11.84	5.03
Femurkopf/-halsübergang (peripher)	22.69	6.19

Tabelle 14: Vergleich der subchondralen Reaktion operierte Seite / Kontrollseite

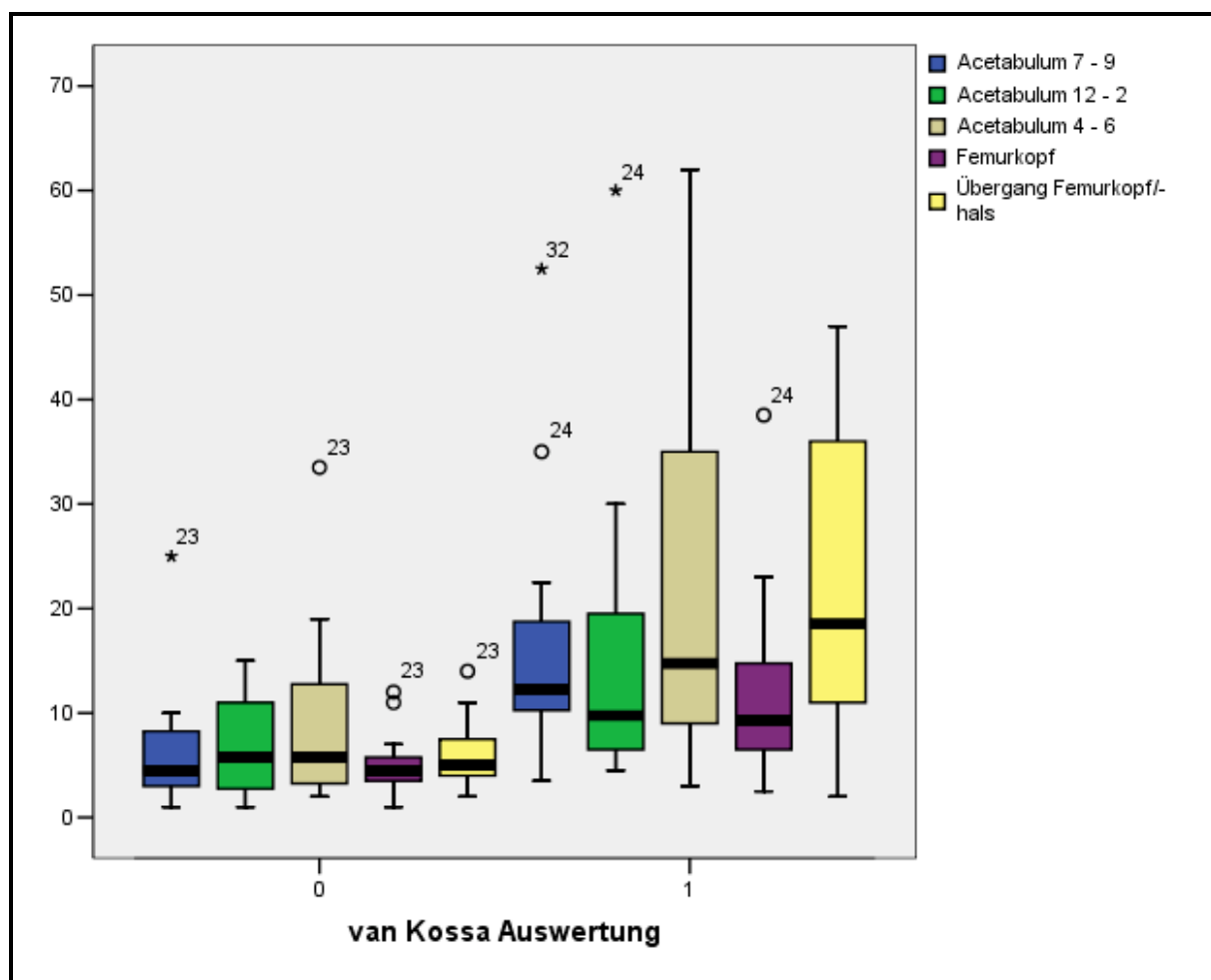


Diagramm 12: Boxplot der Auswertung mit van Kossa/McNeal-Färbung

Es zeigten sich höchst signifikante Unterschiede zwischen der operierten Seite (0) und der nichtoperierten Seite (1) ($p = 0.0001$). Die stärkste Reaktion fand sich am Übergang des Femurkopfes zum Femurhals am Ort der sattelähnlichen Zubildung (siehe Dia. 12).

Eine deutliche subchondrale Reaktion konnte auch im Acetabulum-Sektor 4-6 gefunden werden.

2. Aufschlüsselung nach Zonen

Die untenstehende Tabelle 15 zeigt die Werte der van Kossa-/McNeal-Färbung nach Zonen gegliedert.

Stelle	Zonen operierte Seite		Zonen Kontrollseite	
	labral	central	labral	central
Acetabulum				
Sektor 7-9	19.19	14.00	6.19	6.13
Sektor 12-2	13.56	16.5	8.44	5.31
Sektor 4-6	26.00	17	11.00	7.06
Femurkopf	intermediär	central	intermediär	central
	9.86	14.44	6.19	2.94

Tabelle 15: Vergleich der subchondralen Knochenreaktionen nach Zonen

Die Tabelle 15 zeigt verstärkte Reaktionen labrumnah im Acetabulum-Sektor 7-9 und zentral am Femurkopf, die mit den Knorpelschäden der anderen Ergebnisse korrelieren.

Die stärksten Reaktionen wurden am Acetabulum im Sektor 4-6 gefunden.

3. Aufschlüsselung nach Zeit

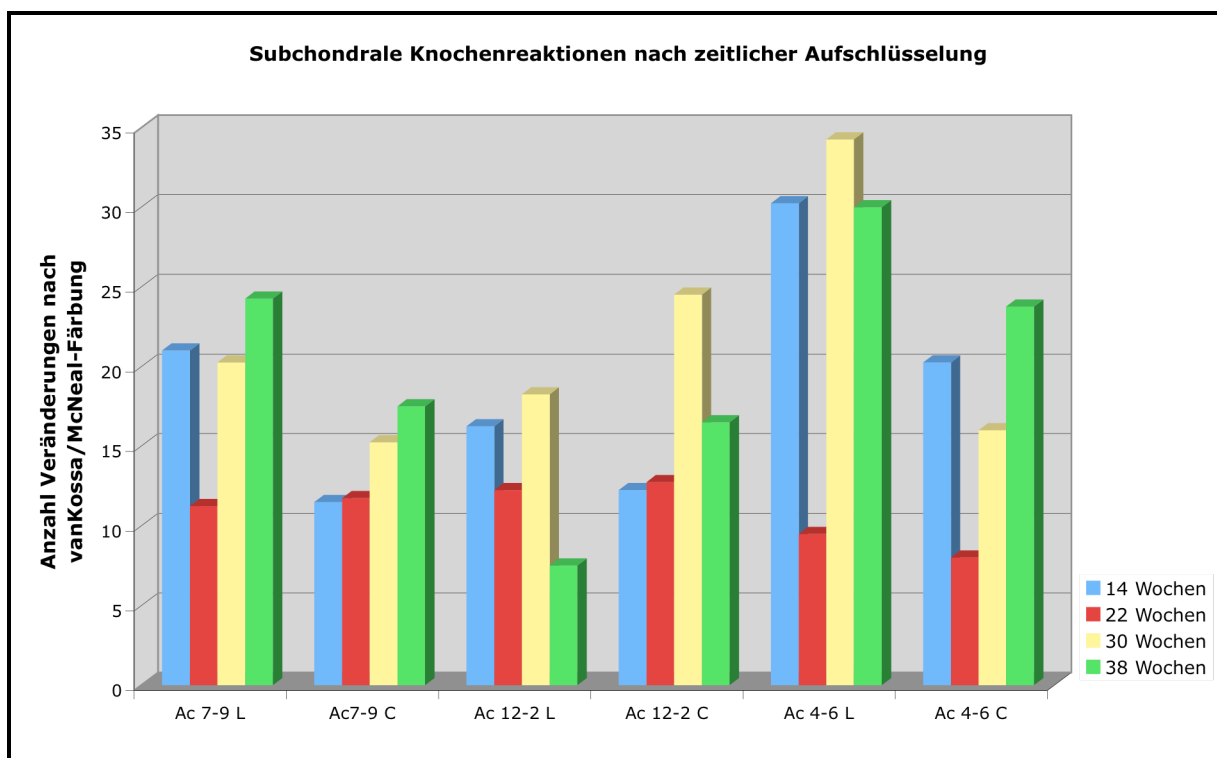


Diagramm 13: Vergleich der subchondralen Knochenreaktionen nach Zeit

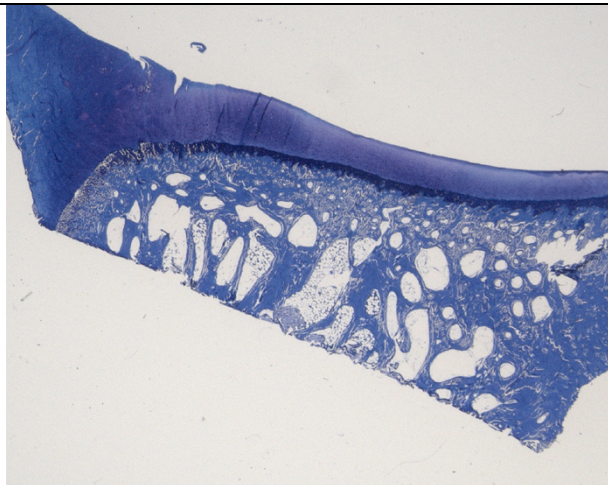
Dem Diagramm 13 kann entnommen werden, dass im Acetabulum-Sektor 4-6 bereits nach 14 Wochen ausgeprägte Knochenreaktionen stattgefunden hatten, die tendenziell nach 38 Wochen jedoch nicht viel stärker geworden sind.

Diese Knochenreaktionen lassen sich histologisch auch mit den Toluidin-O gefärbten Dickschnitten visualisieren.

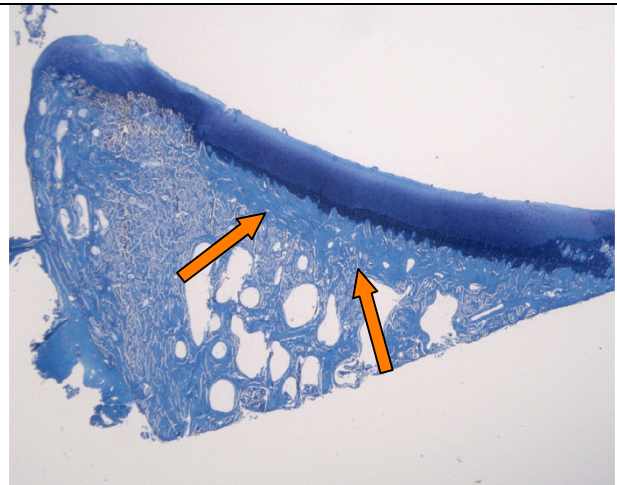
Die Bilder links zeigen unveränderte Strukturen (1a und 2a). Die Bilder rechts zeigen die typischen verdickten und dichteren subchondralen Knochenplatten (siehe orange Pfeile in Abb. 21).

1b) Verändertes Acetabulum, Sektor 4-6

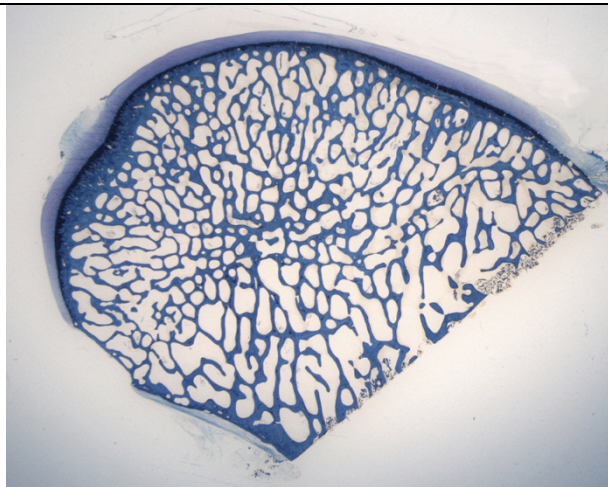
2b) Sattelähnlichen Zubildung am Femurkopf



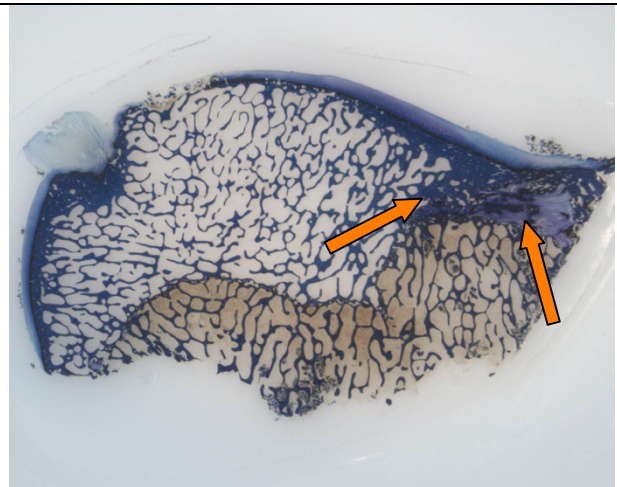
1a) Schaf 1005, Acetabulum 7-9 links



1b) Schaf 1013, Acetabulum 4-6 rechts



2a) Schaf 1012, Femurkopf rechts



2b) Schaf 1019, Femurkopf links

Abbildung 21: Vergleich der subchondralen Knochenplatte

4.5 Immunhistochemische Auswertung

4.5.1 Nachweis von Kollagen Typ II-Überproduktion

Die Anzahl der gefärbten Stellen pro Fläche wurden wie im Kapitel „Material- und Methoden“ in die vier Grade 0 - 3 eingeteilt. Die steigenden Grade repräsentieren das zunehmende Ausmass der Chondrozytenreaktionen. Indirekt kann mit dieser Methode die Frühreaktion der Osteoarthritis bestätigt werden.

Diagramm 14 zeigt, wie viele von insgesamt 10 Schafen den Grad 0, 1, 2 oder 3 aufwiesen.

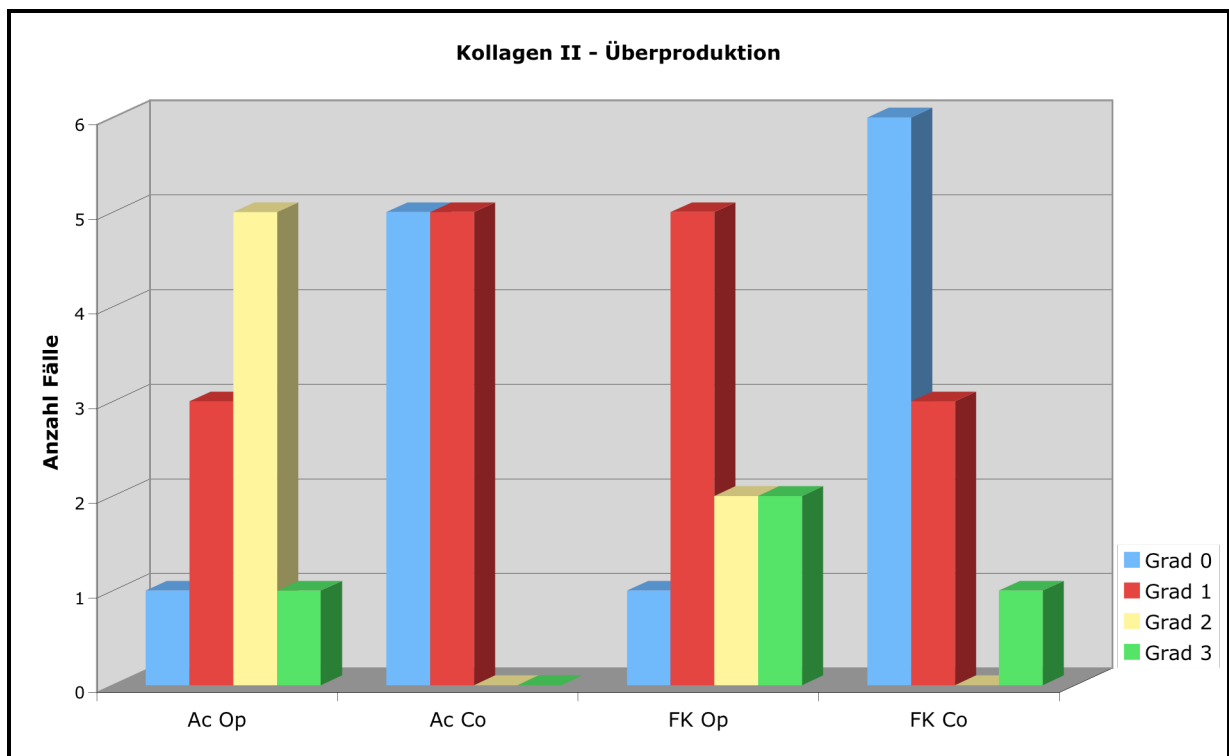


Diagramm 14: Nachweis von Kollagen II-Überproduktion

Die operierten Hüftseiten zeigten deutlich höhere Grade als die nichtoperierten Seiten (siehe Dia. 14).

4.5.2 Nachweis von Kollagen II-Spaltprodukten

Es wurden je drei beispielhafte Präparate mit deutlich (wenig/mittel/stark) ausgeprägten Kollagen II-Färbungen ausgewählt. Diese Präparate wurden mit je 2 Antikörpern gegen die Spaltstellen COL 2 3/4C Sh bzw. COL 2 3/4 M behandelt.

Beim Nachweis der Spaltprodukte ging es nicht darum, eine statistische Signifikanz zu finden, sondern einen Vergleich aufzuzeigen. Es konnte eine gewisse Korrelation zwischen Kollagen II-Überproduktion, COL 2 3/4C Sh und COL 2 3/4 M festgestellt werden. Wie unten aufgelistet, wiesen tendenziell die Präparate mit höheren Kollagen II-Graden auch höherer Spaltprodukt-Grade auf und umgekehrt.

6 von 6 Präparaten mit Kollagen II-Grad 2 - 3 ⇔ Spaltprodukt-Grad 1 - 3

1 von 3 Präparaten mit Kollagen II-Grad 1 ⇔ Spaltprodukt-Grad 1 - 3

2 von 3 Präparaten mit Kollagen II-Grad 0 - 1 ⇔ Spaltprodukt-Grad 0 - 1

Die Abbildung 22 zeigt Bildbeispiele von immunhistochemisch behandeltem Knorpel aus einer Kontrollseite ohne Kollagen II-Anfärbung (1a – 3a) und Knorpel aus einer operierten Seite mit starker Kollagen II-Anfärbung (1b – 3b).

- Die Präparate 1a und 1b wurden mit einem Antikörper gegen Kollagen II gefärbt.
- Die Präparate 2a und 2b wurden mit einem Antikörper gegen die Spaltstelle COL 2 3/4C Sh gefärbt.
- Die Präparate 3a und 3b wurden mit einem Antikörper gegen die Spaltstelle COL 2 3/4 M gefärbt.

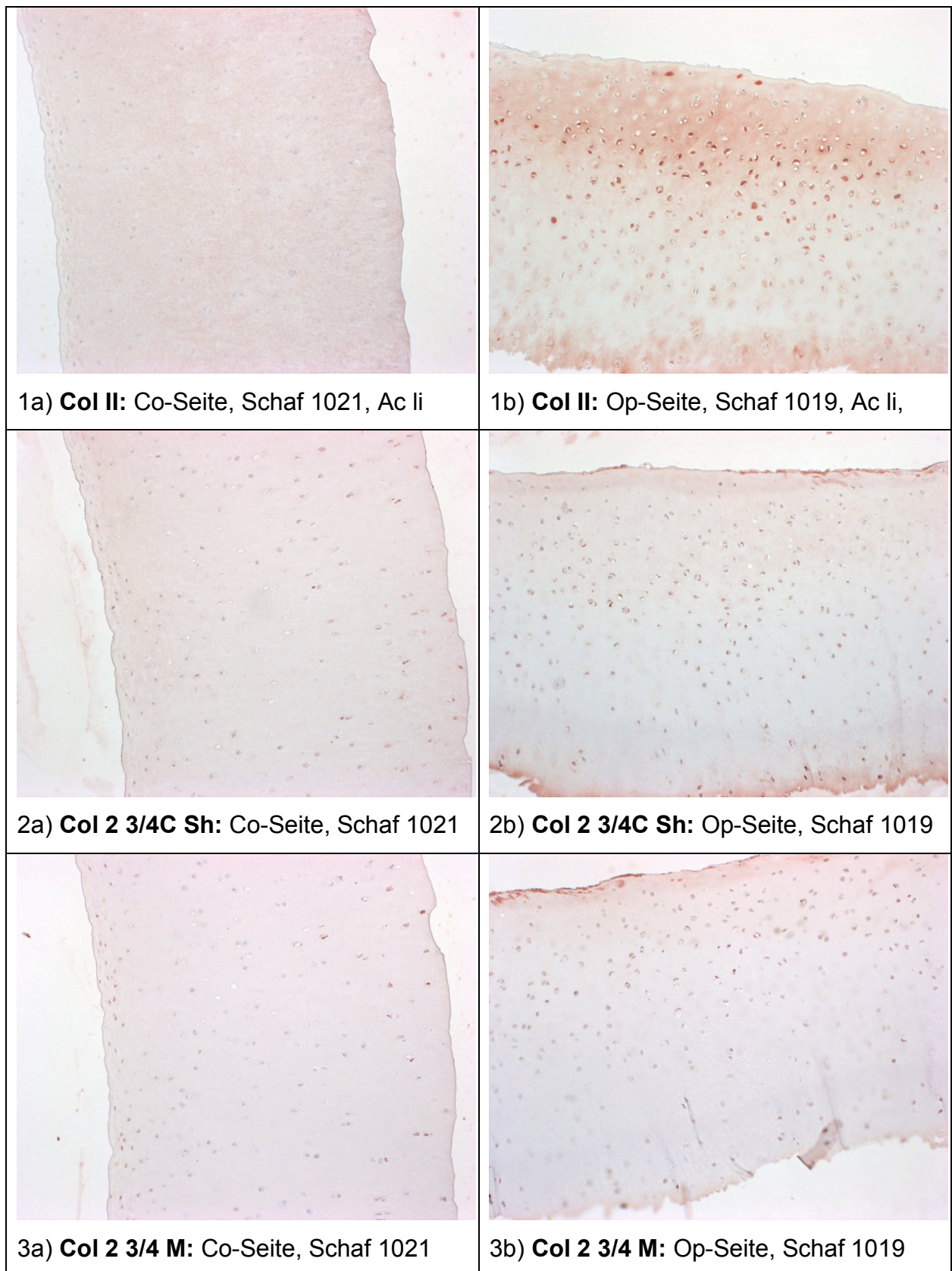
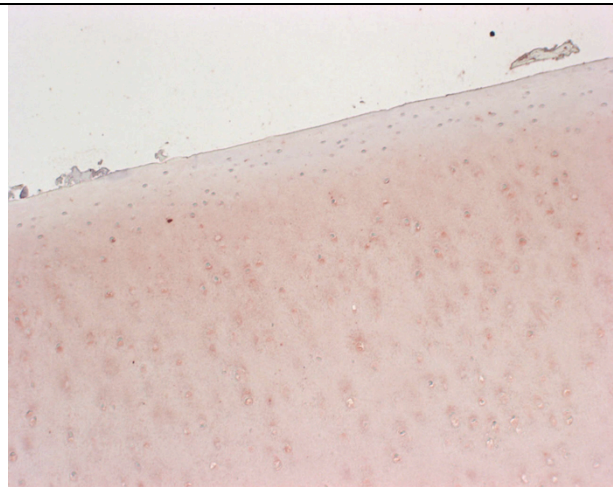


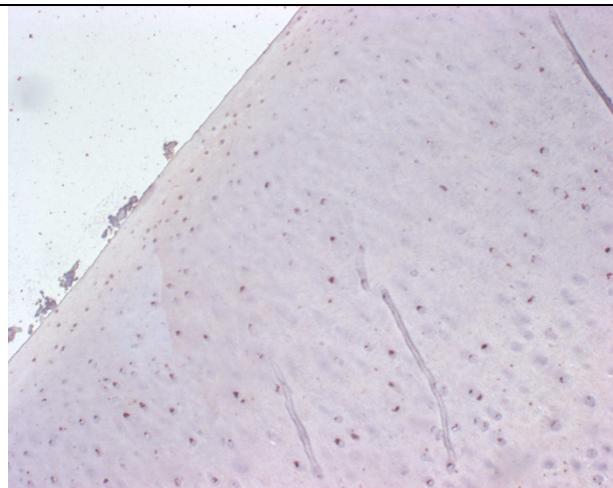
Abbildung 22: Immunhistochemischer Vergleich Kollagen II-Spaltprodukte

Mit allen drei Antikörpern wurde der Knorpel aus der operierten Seite stärker angefärbt als der Knorpel der Gegenseite.

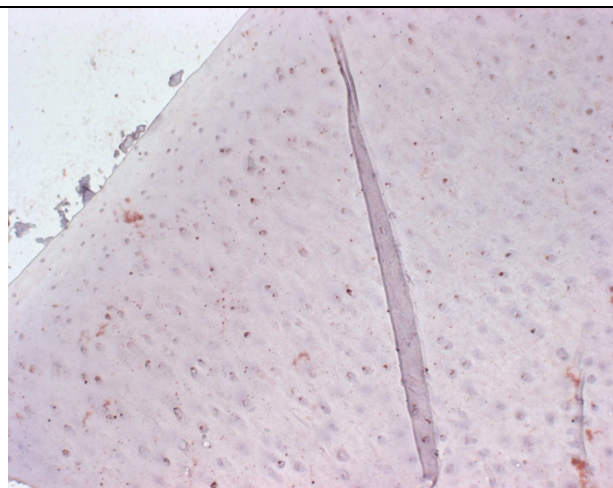
Die projekteigenen Präparate wurden mit projektfremden Präparaten, die mit den gleichen Antikörpern gefärbt worden waren, verglichen. Jene Präparate stammten aus einem makroskopisch gesunden Knie eines zweijährigen Schafes. Die Präparate wurden in einem späteren Färbeprozess behandelt. Sie sollten als Vergleichskontrolle dienen (siehe Abb. 23).



1) **Col II:** gesunder Knorpel



2) **Col 2 3/4 Sh:** gesunder Knorpel



3) **Col 2 3/4 M:** gesunder Knorpel

Abbildung 23: Gesunder Knorpel aus Tibiaplateau als Vergleich

Die Fotos 1 - 3 in Abbildung 23 mit den projektfremden, gesunden Knorpel-Präparaten zeigten eine stärkere Anfärbung der Matrix und mehr angefärbte Zellen, als die projekteigenen Knorpelpräparate der Kontrollseite. Die Anfärbungen mit allen drei Antikörpern lagen zwischen der Kontrollseite und der operierten Seite.

4.6 Biochemische bzw. molekularbiologische Auswertung

Von insgesamt 16 Schafen stammten 6 Schafe aus dem Pilotprojekt. Leider wurden von diesen 6 Schafen weder Knorpelchips noch Synovia entnommen. Deshalb erfolgte die biochemische bzw. molekularbiologische Auswertung nur von 10 Schafen (Nr. 1013 bis 1022).

Für die statistische Auswertung wurden nur die Werte der nichtoperierten Hüfte von den Schafen 1014, 1019 und Schaf 1020 hinzugezogen, der Mittelwert gebildet und als Kontrollwert eingesetzt, da die anderen Schafe entweder kleine Veränderungen oder Synovialitiden aufwiesen, welche die Ergebnisse verfälscht hätten.

Der Vergleich der Werte der operierten Hüften mit dem errechneten Kontrollwert ergab keine statistische Signifikanz.

Wurde der Wert der operierten Hüfte mit dem Wert der entsprechenden Gegenseite verglichen, zeigte sich aber eine deutliche Tendenz (siehe Tab. 16).

OA-Marker	Vergleich der Konzentrationen (Op versus Co)
PGE ₂	Bei 9 von 10 Schafen erhöht
COX-2	8 von 10 erhöht
Synovia-Proteine	7 von 10 erhöht
MMP-3	6 von 10 erhöht
NO	3 von 6 erniedrigt
iNOS	6 von 10 erniedrigt

Tabelle 16: Vergleich der OA-Marker operierte Seite versus Kontrollseite

Die Tabelle 16 zeigt, dass PGE₂, COX-2, Synovia-Proteine und MMP-3 in mehr als der Hälfte der Fälle erhöht waren.

Die Hälfte oder mehr Fälle wiesen für NO und iNOS erniedrigte Konzentrationen auf.

5 DISKUSSION

5.1 Versuchsmodell

Verschiedene Studien zeigten, dass die grössten Schäden bei Impingement-Patienten überwiegend an derselben Stelle im Gelenk lokalisiert waren [4, 6-8, 10]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde erwartet, dass die erzeugten Schäden in den Schafhüften ebenfalls an den umschriebenen Stellen zu finden seien.

Unterschiedliche Orte der Schäden beim Menschen und beim Schaf:

- Die Stellung des Hüftbeins beim **Menschen** ist caudocranial ausgerichtet. Der unrunde Teil am Femurkopf/-hals wird am häufigsten cranioventral in der peripheren Zone gefunden [49]. An der im Gelenk gegenüberliegenden Stelle im Acetabulum d.h. im Sektor 12-2 werden Labrum- und Knorpelschäden angetroffen (siehe Abb. 24).
- Das Hüftbein des **Schafes** liegt schräg in ventrocranialer Richtung. Durch die Varisation wurde der dorsale Femurkopf/-halsübergang ins Acetabulum verlagert. Wie erwartet, entstanden dort und auf der im Gelenk gegenüberliegenden Stelle im Acetabulum d.h. im Sektor 7-9 ebenfalls die Hauptschäden (siehe Abb. 24).

Demnach stimmen die entstandenen Schäden an der unrunden Femurkopfstelle und der in Rotationsrichtung gegenüberliegenden Acetabulumstelle beim Schaf gut mit jenen der Impingement-Patienten überein. Das Schaf hat sich somit für das Versuchsmodell als geeignet erwiesen.

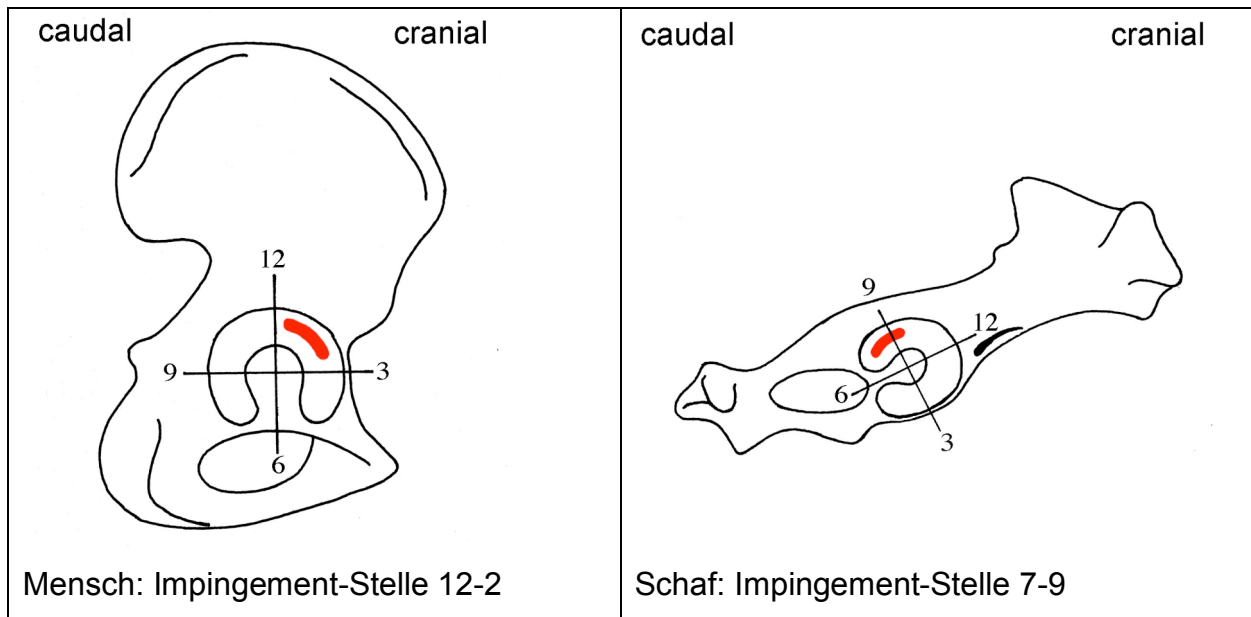


Abbildung 24: Vergleich Impingement-Stellen bei Mensch und Schaf

5.2 Probenentnahmemethode

Da durch einen uns unbekannten Grund die Hüften der Kontrollseite ebenfalls Veränderungen, wenn auch nur geringfügige, aufwiesen und häufig eine Synovialitis angetroffen wurde, eigneten sich die Gegenseiten nicht uneingeschränkt um Kontrollwerte zu gewinnen. Ein möglicher Grund für diese Befunde könnte eine Überbelastung durch Verlagerung des Gewichtes auf die gesunde Hüftseite gewesen sein. Es kann möglicherweise hilfreich sein, aus einem nicht tangierten Gelenk Proben zu entnehmen, z.B. Schultergelenk.

Von 6 Schafen aus dem Pilotprojekt, die ebenfalls in die Studie integriert wurden, existierten weder Knorpelchips noch Synovia-Proben. Deshalb konnte die immunhistochemische, biochemische und molekularbiologische Analyse nur von 10 Schafen durchgeführt werden.

5.3 Ergebnisse

Die vorliegende Studie konzentrierte sich auf frühe degenerative Veränderungen am Hüftgelenk des Schafes, die den Pathomechanismus durchlaufen sollten, der mit dem am Hüftgelenk des Menschen vergleichbar ist.

5.3.1 Statistik

Die statistisch auswertbaren Daten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 12.0 ausgewertet. Es wurden die Statistik-Tests Anova-Rep und Anova-T angewendet. Das Programm und die Tests haben sich für die Datenanalyse dieser Arbeit bewährt.

5.3.2 Radiologie

Um den durch die Varisation verkleinerten Winkel zwischen Oberschenkelchaft und Oberschenkelkopf exakt mit einer Ausmessung kontrollieren zu können, hätte die Lagerungsmethode noch genauer standardisiert werden sollen. Für eine exakte Winkelmessung müsste in einer zukünftigen Studie optimalerweise eine Computertomographie erstellt werden.

5.3.3 Deskriptive Auswertung

Die Tabellen (5 und 6) und Diagramme (1 und 2) zeigen, dass am Acetabulum vor allem im Sektor Ac 7-9 eine mechanische Belastung des Labrums und des Übergangs Labrum/Knorpel mit konsekutiver Schädigung stattgefunden hat. Die Sektoren 12-2 und 4-6 zeigten die für das Femoroacetabuläre Impingement typischen Labrumschäden und Schäden am Labrum/Knorpelübergang nicht. Im Gegensatz dazu gab es in den Sektoren 4-6 und 12-2 auch histologische Knorpelveränderungen (siehe Mankin-Auswertung), jedoch ohne signifikant pathologische Veränderungen

der Oberfläche im Sinne einer Überbelastung oder einer fortgeleiteten Osteoarthritis (siehe Dia. 3)

Die Schädigungen am Labrum/Knorpelübergang (siehe Dia. 5) im Sektor 7-9 waren bereits nach 14 Wochen bei allen operierten Hüften sichtbar. Im Frühstadium entstanden Aufrauhungen und Knorpelabhebungen. Diese Veränderungen werden „Teppichphänomen“ genannt. Im späteren Verlauf verschlimmerten sich die Schäden, das Labrum separierte sich vom Lunarknorpel, Längsrisse oder sogar Auffaserungen entstanden an dieser Übergangsstruktur. Diese Zunahme der Pathologie deckt sich mit den Befunden, wie sie beim Menschen gefunden werden, deshalb darf angenommen werden, dass diese Schäden durch Impingement entstanden sind.

Die sattelähnliche Zubildungen, welche in sämtlichen operierten Hüften am Femurkopf/-halsübergang gefunden wurden, liegen dem Acetabulumsektor 7-9 gegenüber. Es scheint klar, dass diese Veränderungen durch Impingement verursacht wurden, indem nach der Varisation der unrunde Femurkopf/-hals-Teil in Flexion mit dem Acetabulumrand in Konflikt trat.

Bei der humanen Impingementhüfte findet sich am Kopf/Halsübergang eine zungenähnliche Knorpelausdehnung, die geschädigt wird [5]. Zudem werden beim Menschen am peripheren Femurkopf ebenfalls Schädigungen des Knorpels gefunden, die sich in einer bräunlichen Verfärbung zeigen und deutlich von gesundem Knorpel unterscheiden lassen [8].

5.3.4 Auswertung der Klassifizierung nach Bauer

Der Zusammenhang zwischen den entstandenen Schäden und den verursachenden Kräften, wie es Bauer vorgeschlagen hat, deckte sich mit den Beobachtungen dieser Arbeit.

Auffallend war, dass am Femurkopf nur Krater und Fibrillationen oder eine Kombination von beidem entstanden waren. Am Acetabulum wurden auch Risse

gefunden. Anscheinend wirkten sich die intraartikulären Kräfte anders auf den Femurkopfknochen aus als auf den Lunarknochen. Da durch die Variation in Flexion der Acetabulum-Radius gegenüber dem Femurkopf-Radius kleiner ist, wirkten möglicherweise die Scherkräfte in einem steileren Winkel auf das Acetabulum ein.

5.3.5 Auswertung der Gradierung nach Outerbridge

Mit der Gradierung und Auswertung nach Outerbridge konnte erneut bestätigt werden, dass durch die Variation der Knochen im Sektor 7-9 und peripher am Femurkopf am häufigsten und stärksten geschädigt wurde.

5.3.6 Auswertung der Gradierung nach Mankin

Am operierten Acetabulum zeigten die Sektoren 7-9 die grössten histologischen Veränderungen (MG-Mittelwert 5.72), die mit den Befunden der makroskopischen Auswertung korrelierten. Der höchst signifikante Unterschied der Mankin-Grade der operierten Hüfte gegenüber der Kontrollhüfte als Zeichen einer degenerativen Knorpelveränderung zeigte, dass mit der Varisation des proximalen Femurs Osteoarthritis induziert werden konnte. Im Acetabulum-Sektor 4-6 (MG-Mittelwert 5.03) wurden annähernd gleich hohe Werte gefunden, die aber nicht mit makroskopisch sichtbaren Oberflächenveränderungen korrelierten.

Die labrumnahen Veränderungen am Acetabulum im Sektor 7-9 entsprechen der postulierten Zone des Impingement-Mechanismus im Frühstadium.

Die sehr hohen Mankin-Grade am Femurkopf/-halsübergang sind auf die entstandenen sattelähnlichen Knorpel-/Knochenzubildungen zurückzuführen. Beim Menschen wurden peripher makroskopisch und histologisch ähnliche Veränderungen des Knorpels gefunden [8].

Zentral am Femurkopf waren auch Veränderungen entstanden. Beim Menschen mit asphärischem Femurkopf werden an dieser Stelle keine makroskopisch sichtbaren Knorpelläsionen angetroffen. Eine Probeentnahme für eine histologische Untersuchung würde eine Knorpelschädigung hinterlassen. Im intermediären Bereich, d.h. am dorsalen Knorpelstück wurden kaum Veränderungen gefunden.

Der Mankin-Auswertung nach zeitlicher Aufschlüsselung kann entnommen werden, dass im Acetabulum am Sektor 7-9 in der labralen Zone schon früh eine degenerative Osteoarthritis begonnen hat. Mit zeitlicher Verzögerung zeigte sich im gleichen Sektor in der zentralen Zone, dass sich die Knorpeldegeneration gegen die Fossa acetabuli hin ausdehnt. Die Ausbreitung von labral nach zentral wurde beim Menschen makroskopisch ebenfalls beobachtet und wird als ein sich ausbreitender Mechanismus postuliert. Da aber beim Menschen vom Acetabulum keine

Knorpelproben entnommen werden können, existiert keine histologische Auswertung dieser Zonen.

Der zeitlichen Aufschlüsselung war ausserdem zu entnehmen, dass nach 38 Wochen sämtliche Sektoren und Zonen der operierten Seite MG-Mittelwerte über 6 erreichten. Diese Tatsache lässt darauf schliessen, dass am Acetabulum Osteoarthritis entstand, die durch einen Mechanismus ausgelöst wurde, der nicht mit dem Femoroacetabulären Impingement erklärt werden kann. Denkbar wäre, dass es sich bei diesem Phänomen auch um eine Folge von matrixdegradierender Enzyme (MMP's) handelt, die von Chondrozyten an anderen Stellen sezerniert wurden und den Knorpel ebenfalls schädigten.

5.3.7 Auswertung mit van Kossa-/McNeal Tetrachrom-Färbung

Die stärkste Reaktion zeigte sich am Übergang des Femurkopfes zum Femurhals. Diese starke Knochenreaktion entspricht der Sattelbildung und auch dem postulierten Impingement an dieser Stelle. Diese Anbaureaktionen fand man auch in den histologischen Auswertungen (**p = 0.0001**).

Es wurde festgestellt, dass im Acetabulum im Sektor 4-6 ausgeprägte subchondrale Knochenreaktionen stattgefunden hatten, die bereits nach 14 Wochen bestanden. Der Sektor 7-9 zeigte ebenfalls eine starke Knochenreaktion mit makroskopischen und histologischen Veränderungen, die sich parallel in den gleichen Zeitabschnitten entwickelten. Der Sektor 4-6 wies jedoch histologisch eine verzögerte Osteoarthritis nach 38 Wochen auf. Makroskopisch wurden jedoch kaum Veränderungen gefunden. Der Pathomechanismus am Sektor 4-6 scheint einen anderen Verlauf zu nehmen als am Sektor 7-9. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Veränderungen im Sektor 4-6 nicht direkt um das Impingement-Phänomen, sondern um einen Nebeneffekt handelte. Da diese Region der Impingementregion 7-9 gegenüber liegt, könnte dies Folge eines erhöhten Anpressdrucks des Kopfes während des Impingementvorganges sein. Dies liesse sich mechanisch gesehen dadurch erklären, dass ein Anstehen des Hüftkopfes am Pfannenrand bei Fortdauer

der Krafteinwirkung zu einem Aushebeln (Subluxation) des Kopfes auf der gegenüberliegenden Seite der Hüftpfanne führen müsste. Ähnliche, bisher nicht erklärte Knorpelveränderungen finden sich auch in der menschlichen Hüfte in dem der Impingementregion gegenüberliegenden Hinterhorn.

5.3.8 Molekulare Marker für Osteoarthritis

Die Stoffwechsel-Enzyme (MMP-3), Mediatoren (NO/iNOS, PGE₂/COX-2), und Synovia-Proteine wurden in dieser Arbeit, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, herbeigezogen und analysiert, da bekannt ist, dass sich die Konzentrationen bei OA im Knorpel bzw. in der Synovia verändern [33, 62].

Wie bereits erwähnt, standen nur Proben von 10 Versuchstieren für diese Analysen zur Verfügung. Zumindest in dieser Gruppengrösse ergaben sich damit keine statistisch signifikanten Unterschiede. Im Vergleich der Werte der operierten Seite zu den Werten der nichtoperierten Seite, ohne Rücksichtnahme auf die im Kapitel „Resultate“ erwähnten Veränderungen der nichtoperierten Seite, konnte aber gezeigt werden, dass sich die Konzentrationen von PGE₂, COX-2, die Synovia-Proteine und MMP-3 wie erwartet bei Osteoarthritis erhöhten. Die erniedrigten Werte von NO bzw. iNOS zeigten, dass sich NO gegenüber PGE₂ gegenläufig verhielt, was ebenfalls vermutet wurde und auch schon in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte [33, 63].

5.3.9 Nachweis von Kollagen II-Überproduktion und -Spaltprodukten

Der Nachweis von Kollagen II-Überproduktion konnte erbracht werden. Die operierte Hüftseite zeigte am Acetabulum und am Femurkopf deutlich höhere Grade als auf der nichtoperierten Seite. Zu Mankin- (MG) und Outerbridge-Graden konnte jedoch keine signifikante Korrelation gefunden werden.

Beim Nachweis der Kollagen II-Spaltprodukte mit COL 2 3/4 M stellte Hollander die stärkste Färbung hauptsächlich periterritorial fest [45]. Bei jenen Schnitten handelte

es sich um Gefrierschnitte. In unseren Schnitten wurde das Zytoplasma der Chondrozyten stark dunkelrot angefärbt und die Matrix zeigte nur eine leichte gleichmässige bis wolkige Rosafärbung. Für diese Arbeit wurden jedoch Paraffinschnitte angefertigt. Bei der Verarbeitung zu Paraffinschnitten könnte die Tripelhelix gespalten worden sein, so dass die Antikörper (COL 2 3/4 M) vermehrt binden konnten (pers. Kommunikation: A.R. Pool).

Die von den Chondrozyten produzierten Proteasen zerstörten möglicherweise schon zu Beginn der OA die neu synthetisierten Kollagene noch bevor sie sezerniert wurden [38]. Diese Gründe könnten eine Erklärung für die starke Färbung der Zellen sein.

Die Matrix wurde in keinem Fall, wie Hollander bei höheren Mankin-Graden beschrieb, stark und deutlich angefärbt [41, 44], es konnte bloss eine wolkige Anfärbung der Matrix gefunden werden.

Die eher milde Färbung der Matrix ist wahrscheinlich auch darauf zurückzuführen, dass die Knorpelchips nicht direkt aus den Stellen mit dem makroskopisch sichtbaren, grössten Schaden entnommen wurden, da diese Knorpelstücke für die konventionelle Histologie in Plastikblöcke eingebettet wurden.

Um die Methode und die Ergebnisse mit gesundem Knorpel zu vergleichen, wurden Präparate herbeigezogen, die aus einem makroskopisch unveränderten Kniegelenk (proximales Tibiaplateau) eines projektfremden 2-jährigen Schafes stammten. Diese Vergleichspräparate zeigten eine stärkere Anfärbung der Matrix und mehr gefärbte Chondrozyten als die Knorpelpräparate der ungeschädigten Kontrollhüften. Allerdings wurden die Vergleichspräparate in einem späteren Färbevorgang hergestellt und sind daher nicht unter den genau gleichen Bedingungen entstanden. Ob die verwendeten Antikörper tatsächlich an die erwarteten Epitope gebunden hatten, ist somit nicht absolut sicher. Ebenso wäre ein Methodedefehler möglich, denn in der vorliegenden Arbeit wurden die Präparate mit Hyaluronidase vorbehandelt. Das Ergebnis wäre möglicherweise besser gewesen, wäre Chondroitinase ABC angewendet worden (pers. Kommunikation: A.R. Pool).

5.4 Zusammenfassung

Der Mechanismus des Femoroacetabulären Impingements und der daraus folgenden Schädigung der Hüfte konnte experimentell mit diesem Tiermodell nachvollzogen werden. Durch eine 15° Varisation am proximalen Femur konnten Verhältnisse im Hüftgelenk des Schafes geschaffen werden, die vergleichbar sind mit jenen des Menschen mit Impingementproblematik. Dadurch entstanden die typischen, regional umschriebenen Knorpelschäden, die auf makroskopischer und histologischer Ebene höchst signifikant nachgewiesen wurden.

Die Hauptschäden lokalisierten sich an den postulierten Stellen und zeigten die, für das Impingement typischen Veränderungen.

Generell konnte eine Progredienz festgestellt werden. Die Impingement-Stellen scheinen ihren Hauptschaden in der labralen Zone bereits bis zur 14. Wochen erlitten zu haben. Es zeigte sich dort eine Progredienz der Knorpelschäden nach länger andauernder Laufzeit gegen den zentralen Pfannenbereich. Überdies kam es zu einer deutlichen Zunahme der Degeneration über den Verlauf von 38 Wochen in Gelenkbereichen, die nicht direkt dem Impingementkonflikt unterlagen. Dies spricht für eine generalisierte Ausdehnung der osteoarthritischen Veränderungen.

Am Übergang Femurkopf zum Femurhals wurde eine sattelähnliche Zubildung festgestellt, die als Ausdruck einer deutlichen Knochen- bzw. Knorpelreaktion durch die veränderte Belastungssituation nach der Varisationsosteotomie interpretiert werden muss. Diese Veränderung erscheint ausgeprägter aber dennoch vergleichbar mit der Veränderung am menschlichen Hüftkopf beim Femoroacetabulären Impingement.

Es wurden auch osteoarthritische Veränderungen an Stellen im Gelenk festgestellt, wo sie nicht erwartet wurden. Mit der Varisation wurde durch lateromediale Drehung die unrunde Stelle des Femurkopfs in Richtung Hauptbelastungszone gebracht, um das Femoroacetabuläre Impingement zu reproduzieren. Als Nebeneffekt der

Operation könnten Inkongruenzen zwischen den Gelenkpartnern entstanden sein, die möglicherweise lokale statische Überbelastungen verursachten. Es wurden Schäden am Acetabulum in den Sektoren 12-2 bzw. 4-6 und zentral am Femurkopf beobachtet, die mit dem Impingement-Mechanismus als Sekundärveränderung interpretiert werden können. Dafür spricht auch das zeitlich verzögerte Auftreten dieser Veränderungen. An diesen Stellen konnte im subchondralen Knochen bereits nach 14 Wochen mit der van Kossa-/McNeal Tetrachrom-Färbung erhöhte Aktivität festgestellt werden, ohne dass zu diesem Zeitpunkt deutliche makroskopische oder histologische Veränderungen gefunden werden konnten. Im weiteren Verlauf wurde dann jedoch eine deutlich progrediente Zunahme der Knorpelveränderungen beobachtet. Auffällig war auch, dass die Acetabulum-Sektoren 12-2 und 4-6 keine Labrumschäden aufwiesen. Neben dem Impingement-Mechanismus und den sekundären Scherkräften, könnte ausserdem ein inkongruenzbedingter Überbelastungsmechanismus in diesen Regionen eine Rolle gespielt haben. Dieser Mechanismus entspräche jedoch auch dann dem natürlichen Verlauf einer Osteoarthritis, wenn es zu typischen Kopfdeformierungen und Osteophytenbildung käme. Die folgende Abbildung 25 zeigt die Drehungsrichtung des Femurkopfes und die Stellen dorsal und ventral am Acetabulum mit den grössten Schäden. Die ventrale Schädigung kann durch Inkongruenz oder rezidivierendes Aushebeln des Kopfes während des Impingements entstanden sein.

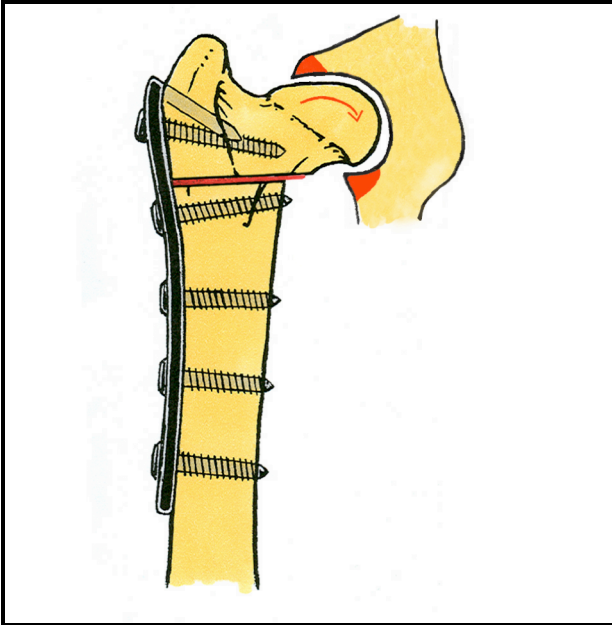


Abbildung 25: Stellen der Hauptschäden am Acetabulum

6 SCHLUSSFOLGERUNG

Die beim Versuchstier angetroffenen Schäden befanden sich in den postulierten Zonen eines Impingementmechanismus und waren vergleichbar mit den Befunden menschlicher Hüften mit einer Impingementpathologie. Damit wird der vermutete Pathomechanismus bei der Pathomorphologie eines asphärischen Hüftkopfes untermauert und rechtfertigt ein darauf basierendes Behandlungskonzept, nämlich die chirurgische Abtragung des asphärischen Kopfanteiles mit Ausdünnung des Kopf/-halsüberganges.

Da sich die durch das Femoroacetabuläre Impingement ausgelöste Osteoarthritis im weiteren Krankheitsverlauf zu generalisieren scheint, ist die Definition des idealen Zeitpunktes für diese Art eines gelenkerhaltenden Eingriffes entscheidend, da bei bereits gravierenden Gelenkschäden die Prognose kaum verbessert werden könnte.

7 AUSBLICK

Die Etablierung eines Tiermodells für diesen Pathomechanismus der Hüftgelenkosteoarthritis eröffnet eine Vielzahl weiterer Studienmöglichkeiten, um Erkenntnisse über Pathomechanismus, Diagnostik und Effizienz von Therapieansätzen zu gewinnen. Neben der Definition des Zeitpunktes und Ausmasses von therapeutischen Eingriffen lässt sich auch der Gewinn durch zukunftssträchtige Techniken wie Knorpeltransplantationen abschätzen. In zukünftigen Arbeiten sollten folgende Schritte optimiert und die aufgeführten offenen Fragen untersucht werden:

- 1) Die radiologische Prüfung der Varisations-Operation sollte noch genauer standardisiert oder die Computertomographie eingesetzt werden, um den entstandenen Femurkopf/-schaft-Winkel präzise messen zu können.
- 2) Die kürzeste Laufzeit sollte weniger als 14 Wochen betragen, damit die Osteoarthritis auch in der sehr frühen Entstehungsphase untersucht werden kann.
- 3) Bei der Schlachtung empfiehlt es sich, zusätzlich Proben aus einem nicht betroffenen Gelenk der vorderen Extremitäten zu entnehmen. Die Gegenseite eignet sich möglicherweise nur bedingt als Kontrolle.
- 4) Für die immunohistochemische Auswertung sollten Proben aus den offensichtlich geschädigten Stellen gewonnen und zu Kryoschnitten verarbeitet werden.
- 5) Beim Nachweis der Kollagen II-Spaltprodukte wurden im gesunden sowie auch im geschädigten Knorpel viele Zellen mit starker perinukleärer Färbung gefunden und es zeigte sich teilweise lichtmikroskopisch ein identisches Bild. Deshalb ist unklar, an welche Epitope die Antikörper gebunden wurden. Ein Methodefehler müsste deshalb in Zukunft ausgeschlossen werden.
- 6) Das Augenmerk sollte auch in den frühen Phasen auf die Sektoren ausserhalb des Impingementbereichs, d.h. den Acetabulum-Sektoren 12-2 bzw. 4-6 und zentral am Femurkopf gerichtet werden, um den sequentiellen Ablauf der Veränderungen weiter abzuklären.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Pauwels, F., *Atlas zur Biomechanik der gesunden und kranken Hüfte, Prinzipien, Technik und Resultate der kausalen Therapie*, in *Atlas zur Biomechanik der gesunden und kranken Hüfte, Prinzipien, Technik und Resultate der kausalen Therapie*. 1973, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York. p. 21-29.
2. Kloen, P., M. Leunig, and R. Ganz, *Early lesions of the labrum and acetabular cartilage in osteonecrosis of the femoral head*. J Bone Joint Surg Br, 2002. **84**(1): p. 66-9.
3. Leunig, M. and R. Ganz, *[Femoroacetabular impingement Häufige Ursache von zur Arthrose führenden Hüftbeschwerden.]*. Unfallchirurg, 2005. **108**(1): p. 9-17.
4. Ganz, R., et al., *Femoroacetabular impingement: a cause for osteoarthritis of the hip*. Clin Orthop, 2003(417): p. 112-20.
5. Siebenrock, K.A., et al., *Abnormal extension of the femoral head epiphysis as a cause of cam impingement*. Clin Orthop Relat Res, 2004(418): p. 54-60.
6. Ito, K., et al., *Femoroacetabular impingement and the cam-effect. A MRI-based quantitative anatomical study of the femoral head-neck offset*. J Bone Joint Surg Br, 2001. **83**(2): p. 171-6.
7. Notzli, H.P., et al., *The contour of the femoral head-neck junction as a predictor for the risk of anterior impingement*. J Bone Joint Surg Br, 2002. **84**(4): p. 556-60.
8. Wagner, S., et al., *Early osteoarthritic changes of human femoral head cartilage subsequent to femoro-acetabular impingement*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. **11**(7): p. 508-18.
9. Mankin, H.J. and L. Lippiello, *Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips*. J Bone Joint Surg Am, 1970. **52**(3): p. 424-34.
10. Byers, P.D., *Post mortem study of the hip joint*. Ann. rheum. Dis., 1970. **29**(15).
11. Caron, J.P., *Synovial Joint Biology and Pathobiology*, in *Equine surgery*, A. Stick, Editor. 1999, Saunders: Philadelphia, Pennsylvania. p. 665-675.
12. Ray Chris S., P.A.R., McIlwraith C. Wayne, *Use of Synovial Fluid and Serum Markers in Articular Disease*, in *Joint Disease in the Horse*, M. Trotter, Editor. 1996, Saunders: Philadelphia. p. 203-214.
13. Poole, A.R., *Cartilage in Health and Disease*, in *Arthritis and Allied Conditions, A Textbook of Rheumatology*, M.L.W. Koopman W.J., Editor. 2005, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 223-269.
14. Alberts, B., Bray D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J., *Die extrazelluläre Matrix bei Tieren*, in *Molekularbiologie der Zelle*, J. Lothar, Editor. 1997, VCH: Weinheim. p. 1161.
15. Kempson, G.E., *Mechanical properties of articular cartilage*. J Physiol, 1972. **223**(1): p. 23P.
16. Poole, A.R., et al., *Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2002. **61 Suppl 2**: p. ii78-81.
17. Thomas, C., *Histopathologie: Lehrbuch und Atlas zur allgemeinen und speziellen Pathologie*, C. Thomas, Editor. 2001, Schattauer: Stuttgart. p. 95-121.
18. Fossum Theresa Welch., H.C., Hulse D., Johnson A., Seim H., Willard M., Carroll G., *Disease of the Joints*, in *Small Animal Surgery*, T.W. Fossum, Editor. 2002, Mosby: St. Louis. p. 1023-1028.
19. Schmidt, R.E., Burkhardt, H., *Klinische Pathophysiologie*. 8. ed, ed. W. Siegenthaler. 2001, Würzburg: Thieme.
20. Kobayashi, M., et al., *Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(1): p. 128-35.

21. Evans, C.H., *The role of proteinases in cartilage destruction*. Agents Actions Suppl, 1991. **32**: p. 135-52.
22. Mort, J.S., et al., *Direct evidence for active metalloproteinases mediating matrix degradation in interleukin 1-stimulated human articular cartilage*. Matrix, 1993. **13**(2): p. 95-102.
23. Pelletier, J.P., et al., *Are cytokines involved in osteoarthritic pathophysiology?* Semin Arthritis Rheum, 1991. **20**(6 Suppl 2): p. 12-25.
24. Dayer, J.M., et al., *Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells*. J Clin Invest, 1986. **77**(2): p. 645-8.
25. Dickinson, S.C., et al., *Cleavage of cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) by matrix metalloproteinases and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*. Matrix Biol, 2003. **22**(3): p. 267-78.
26. Lippiello, L., D. Hall, and H.J. Mankin, *Collagen synthesis in normal and osteoarthritic human cartilage*. J Clin Invest, 1977. **59**(4): p. 593-600.
27. Mankin, H.J., et al., *Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data*. J Bone Joint Surg Am, 1971. **53**(3): p. 523-37.
28. Ehrlich, M.G., H.J. Mankin, and B.V. Treadwell, *Acid hydrolase activity in osteoarthritic and normal human cartilage*. J Bone Joint Surg Am, 1973. **55**(5): p. 1068-76.
29. Evans, C.H. and M. Stefanovic-Racic, *Nitric Oxide in Arthritis*. Methods, 1996. **10**(1): p. 38-42.
30. Goldring, M.B. and F. Berenbaum, *The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide*. Clin Orthop Relat Res, 2004(427 Suppl): p. S37-46.
31. Stryer, L., *Aminosäureabbau und Harnstoffzyklus*, in *Biochemie*, L. Stryer, Editor. 1990, Spektrum der Wissenschaft: Heidelberg.
32. Adams, H.R., *Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide*. J Am Vet Med Assoc, 1996. **209**(7): p. 1297-302.
33. von Rechenberg, B., *Subchondral cystic lesions in horses: A possible explanation of their etiology and pathogenesis at the level of local mediators, matrix degrading enzymes and cytokines*. 1999: p. 137.
34. Bauer, M. and R.W. Jackson, *Chondral lesions of the femoral condyles: a system of arthroscopic classification*. Arthroscopy, 1988. **4**(2): p. 97-102.
35. Outerbridge, R.E., *The etiology of chondromalacia patellae*. J Bone Joint Surg Br, 1961. **43-B**: p. 752-7.
36. Cameron, M.L., K.K. Briggs, and J.R. Steadman, *Reproducibility and reliability of the outerbridge classification for grading chondral lesions of the knee arthroscopically*. Am J Sports Med, 2003. **31**(1): p. 83-6.
37. Geyer, G. and W. Linss, *Toluidine blue staining of cartilage proteoglycan subunits*. Acta Histochem, 1978. **61**(1): p. 127-34.
38. Poole, A.R., et al., *Collagen II turnover in joint diseases*. Acta Orthop Scand Suppl, 1995. **266**: p. 88-91.
39. Mayne, R., et al., *Monoclonal antibody to the aminotelopeptide of type II collagen: loss of the epitope after stromelysin digestion*. Connect Tissue Res, 1994. **31**(1): p. 11-21.
40. Dahlberg, L., et al., *Proteoglycan fragments in joint fluid. Influence of arthrosis and inflammation*. Acta Orthop Scand, 1992. **63**(4): p. 417-23.
41. Hollander, A.P., et al., *Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay*. J Clin Invest, 1994. **93**(4): p. 1722-32.
42. Poole, A.R., Alini M, Hollander A., *Cellular Biology of Cartilage Degradation*, in *Mechanism and Models in Rheumatoid Arthritis*. 1995, Academic Press Ltd. p. 163-193.
43. Dodge, G.R. and A.R. Poole, *Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and*

- osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. *J Clin Invest*, 1989. **83**(2): p. 647-61.
44. Billinghamhurst, R.C., et al., *Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(7): p. 1534-45.
 45. Hollander, A.P., et al., *Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration*. *J Clin Invest*, 1995. **96**(6): p. 2859-69.
 46. Locher, S., et al., *[Inadequate detectability of early stages of coxarthrosis with conventional roentgen images]*. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 2001. **139**(1): p. 70-4.
 47. Siebenrock, K.A., R. Schoeniger, and R. Ganz, *Anterior femoro-acetabular impingement due to acetabular retroversion. Treatment with periacetabular osteotomy*. *J Bone Joint Surg Am*, 2003. **85-A**(2): p. 278-86.
 48. Ganz, R., Leunig M., Ito, K., Werlen, S., *MR arthrography of the hip joint*, in *3rd congress European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology*. 1997: Barcelona. p. 7 - 8.
 49. Schmid, M.R., et al., *Cartilage lesions in the hip: diagnostic effectiveness of MR arthrography*. *Radiology*, 2003. **226**(2): p. 382-6.
 50. Buckwalter, J.A. and S. Lohmander, *Operative treatment of osteoarthrosis. Current practice and future development*. *J Bone Joint Surg Am*, 1994. **76**(9): p. 1405-18.
 51. Wu, J.Z., W. Herzog, and M. Epstein, *Joint contact mechanics in the early stages of osteoarthritis*. *Med Eng Phys*, 2000. **22**(1): p. 1-12.
 52. Adams, M.E. and K.D. Brandt, *Hypertrophic repair of canine articular cartilage in osteoarthritis after anterior cruciate ligament transection*. *J Rheumatol*, 1991. **18**(3): p. 428-35.
 53. Schwartz, E.R., *Animal models: a means to study the pathogenesis of osteoarthritis*. *J Rheumatol*, 1987. **14 Spec No**: p. 101-3.
 54. Pritzker, K.P., et al., *Rhesus macaques as an experimental model for degenerative arthritis*. *P R Health Sci J*, 1989. **8**(1): p. 99-102.
 55. Hasler, E.M., et al., *In vivo knee joint loading and kinematics before and after ACL transection in an animal model*. *J Biomech*, 1998. **31**(3): p. 253-62.
 56. Roberts, M.J., et al., *A new approach for assessing early osteoarthritis in the rat*. *Anal Bioanal Chem*, 2003. **377**(6): p. 1003-6.
 57. Young, A.A., et al., *Regional assessment of articular cartilage gene expression and small proteoglycan metabolism in an animal model of osteoarthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(4): p. R852-61.
 58. Thompson, R.C., Jr., et al., *Osteoarthrotic changes after acute transarticular load. An animal model*. *J Bone Joint Surg Am*, 1991. **73**(7): p. 990-1001.
 59. Nunamaker, D.M., *Experimental models of fracture repair*. *Clin Orthop Relat Res*, 1998(355 Suppl): p. S56-65.
 60. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.
 61. Martin, I., et al., *Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001. **9**(2): p. 112-8.
 62. Okada, Y., et al., *Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium*. *Lab Invest*, 1992. **66**(6): p. 680-90.
 63. Stadler, J., et al., *Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide*. *J Immunol*, 1991. **147**(11): p. 3915-20.

9 ANHANG

I) Toluidin-Blau O-Färbung

Gebrauchsfertige Lösung

0.125 % Toluidin-Blau O in Phosphatpuffer pH 8

Entplastifizieren:

3 x 30 min.	MEA / (2-Methoxyethylacetat), Nr. 8.06061 (MERCK, VWR Int., Dietikon, Schweiz)
2 x 3 min.	Xylol
2 x kurz	100 % Ethanol
2 x "	96 % "
1 x "	70 % "
3 x "	H ₂ O entionisiert

Einfärben:

2 x 2 min.	0.7 % Ameisensäure
10 – 15 min.	Toluidin-Blau O (im Mikrowellengerät auf 60° C erwärmt)

spülen	H ₂ O entionisiert
abtrocknen	Löschpapier
lufttrocknen	
1 x kurz	Xylol
eindecken	Shandon-Mount Toluene Base (Histocom AG, Zug, Schweiz)

II) van Kossa- / McNeal Tetrachrom-Färbung

Lösung 1 (van Kossa)

5 g	Silbernitrat
100 ml	H ₂ O entionisiert

Lösung 2 (van Kossa)

5 g	Natriumhydrogenkarbonat
25 ml	37 % Formaldehyd
75 ml	H ₂ O entionisiert

Lösung 3 (van Kossa)

5 g	Natriumthiosulfat
100 ml	H ₂ O entionisiert

Stamm-Lösung 4 (McNeal Tetrachrom Gegenfärbung)

0.5 g	Methylenblau-Chlorid
0.8 g	Azur A-Eosinat
0.1 g	Methylenviolett
lösen in 500 ml	Glyzerin-Methanol (Mischung aus je 250 ml)
stehen lassen	1) 12 Stunden bei 50° C
	2) 3 Tage bei 37° C
filtrieren und bei RT dunkel aufbewahren	

gebrauchsfertige Lösung 4 (McNealTetrachrome Gegenfärbung)

Stamm-Lösung 4 auf 5 % mit destilliertem Wasser verdünnen

Entplastifizieren:

gleich wie oben

Einfärben:

1 h	Lösung 1 (am hellen Licht)
spülen	H ₂ O entionisiert
5 min.	Lösung 2
15 min.	unter fliessendem Wasser spülen
5 min.	Lösung 3
15 min.	unter fliessendem Wasser spülen
1 h	Lösung 4
spülen	H ₂ O entionisiert
lufttrocknen	
1 x kurz	Xylol
eindecken	Shandon-Mount Toluene Base (Histocom AG, Zug, Schweiz)

III) Immunhistochemische Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen Kollagen II

kurz	lösen des Einbettmediums Paraffin mit Xylol
kurz	rehydrieren in absteigender Alkoholreihe (100 % - 70 %)
10 min.	Pronase, Code S 2013, (Dako A/S, Glostrup, Denmark)
10 min.	unspezifischer Peroxidase-Block mit 3 % H ₂ O ₂ und 0.2 % NaN ₃ in H ₂ O
10 min.	Block unspezifischer Proteinbindungen, Nr. X 0909, (DakoCytomation AG, Zug, Schweiz)
12 h	inkubieren bei Raumtemperatur mit 1° Antikörper Kollagen II Ab-2, monoklonaler Mausantikörper, (Lab Vision, NeoMarkers, Westinghouse, USA) Verdünnung 1 : 20
30 min.	inkubieren bei Raumtemperatur mit 2° Antikörper Dako EnVision, System HRP Mouse, Nr. K 4001 (DakoCytomation AG, Zug, Schweiz)
unter mikroskopischer Beobachtung	AEC-Substrat-Chromogen, Nr. 00-2007 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA)
1 min. eindecken	gegenfärben mit HE Kaisers Glyceringelatine, Nr. 1.09242 (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Zwischen sämtlichen Behandlungsschritten wurden die Proben mit PBS gespült.
Es wurde je ein Schnitt ohne Antikörper als Negativkontrolle hergestellt.

IV) Immunhistochemische Färbung mit polyklonalen Antikörpern gegen Kollagen II-Spaltprodukt

kurz	lösen des Einbettmediums Paraffin mit Xylol
kurz	rehydrieren in absteigender Alkoholreihe (100 % - 70 %)
30 min.	denaturieren bei Raumtemperatur mit 1 % Hyaluronidase in PBS bei pH 7,4 Nr. H 3506, (Sigma, Buchs/SG, Schweiz)
10 min.	unspezifischer Peroxidase-Block mit 3 % H ₂ O ₂ und 0.2% NaN ₃ in H ₂ O
10 min.	Block unspezifischer Proteinbindungen, Nr. X 0909, (DakoCytomation AG, Zug, Schweiz)
12 h	inkubieren bei Raumtemperatur mit 1° Antikörper COL 2 3/4C Short Polyclonal Rabbit Antibody C12C Ab 2699 Lot 260700 (IBEX Diagnostics, Montreal, Canada) Verdünnung 1 : 20
30 min.	inkubieren bei Raumtemperatur mit 2° Antikörper Dako EnVision, System HRP Rabbit, Nr. K 4003 (DakoCytomation AG, Zug, Schweiz)
unter mikroskopischer Beobachtung	AEC-Substrat-Chromogen, Nr. 00-2007 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA)
1 min.	gegenfärben mit HE
eindecken	Kaisers Glyceringelatine, Nr. 1.09242 (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Zwischen sämtlichen Behandlungsschritten wurden die Proben mit PBS gespült.
Es wurde je ein Schnitt ohne Antikörper als Negativkontrolle hergestellt.

V) Immunhistochemische Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen Kollagen II-Spaltprodukte

kurz	lösen des Einbettmediums Paraffin mit Xylol
kurz	rehydrieren in absteigender Alkoholreihe (100 % - 70 %)
30 min.	denaturieren bei Raumtemperatur mit 1 % Hyaluronidase in PBS bei pH 7,4 Nr. H 3506, (Sigma, Buchs/SG, Schweiz)
10 min.	unspezifischer Peroxidase-Block mit 3 % H ₂ O ₂ und 0.2% NaN ₃ in H ₂ O
10 min.	Block unspezifischer Proteinbindungen, Nr. X 0909, (DakoCytomation AG, Zug, Schweiz)
12 h	inkubieren bei Raumtemperatur mit 1° Antikörper COL 2 3/4 M Mouse Monoclonal IgG ₁ Lot 040811 (IBEX Diagnostics, Montreal, Canada) Verdünnung 1 : 20
30 min.	inkubieren bei Raumtemperatur mit 2° Antikörper Dako EnVision, System HRP Mouse, Nr. K 4001 (DakoCytomation AG, Zug, Schweiz)
unter mikroskopischer Beobachtung	AEC-Substrat-Chromogen, Nr. 00-2007 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA)
1 min. eindecken	gegenfärben mit HE Kaisers Glyceringelatine, Nr. 1.09242 (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Zwischen sämtlichen Behandlungsschritten wurden die Proben mit PBS gespült.
Es wurde je ein Schnitt ohne Antikörper als Negativkontrolle hergestellt.

10 DANKSAGUNG

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an PD Dr. Brigitte von Rechenberg, Leiterin der Musculoskeletal Research Unit (MSRU), für die Überlassung des Themas sowie für die ausgezeichnete Betreuung, welche geprägt war von ausserordentlichem fachlichen Wissen und grossem persönlichen Einsatz.

Prof. Dr. Klaus Siebenrock, Leiter der Orthopädischen Chirurgie, Inselspital Bern, möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr angenehme Zusammenarbeit danken.

Dr. Peter Koch, Oberarzt in der Orthopädie, Balgrist, Zürich, danke ich für seinen chirurgische Einsatz.

Herzlichsten Dank geht an Dr. Charles Mamisch für die kompetente Hilfe bei der Auswertung der Histologie und für seinen grossen Einsatz bei der Entstehung dieser Arbeit.

Ein grosses Dankeschön richte ich auch an Kati Zlinsky und Sabina Wunderlin für die Herstellung der qualitativ hervorragenden histologischen Präparate.

Auch Dr. Monica Hilbe möchte ich herzlich Danke sagen für ihre geduldige Hilfe bei der Auswertung der Immunhistochemie.

Ebenso möchte ich mich bei Adrian Fairburn für die speditive Ausführung der biochemischen und molekularbiologischen Laborarbeiten bedanken.

Des Weiteren geht ein grosses Merci an das Anästhesieteam der Pferdeklinik, die RadiologieassistentInnen, die Tierpfleger und Fahrer der Vetsuisse-Fakultät Zürich.

Ein riesiges Dankeschön möchte ich an meine Kolleginnen und Kollegen der MSRU, Oli Génot, Sandra Hanses, Corinne Invernizzi, Sabine Koch, Jens Langhoff, Katja Nuss, Inka Schlemmer, Roland Schubotz und Alessa Waibel, für die gute

Zusammenarbeit und Mithilfe richten. Katja Nuss spreche ich überdies ein riesen Merci aus für Ihre überaus kompetente Korrektur dieser Arbeit. Unsere süssen „Bürohunde“ Frieda, Golda, Lara und Oslo, die mich oft zum Lachen brachten, will ich natürlich auch erwähnen.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine geduldigen Eltern Hans und Mix Fiechter, die mir den Weg, Tierärztin zu werden, überhaupt erst möglich machten und mich stets moralisch und finanziell unterstützt haben. Danke!

Für die moralische Unterstützung bedanke ich mich auch bei meinen beiden lieben Schwestern Christine Hächler und Annelise Hunziker, sowie bei meinen treuen Freunden Marco Eichenberger, Röbi Küng, Malika Marmouq und Verena Leistner, die mir immer wieder eine auflockernde Freizeit boten. Bei Christine, Corinne, Marco, Verena und Tatjana Vukmanovic bedanke ich mich zudem tausendmal fürs Korrekturlesen dieser Dissertation.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Ruth Marie-Estelle Fiechter
Brahmsstrasse 17
CH-8003 Zürich

Geburtsdatum: 20.02.1962

Geburtsort: Teufenthal (AG)

Heimatort: Dürrenroth (BE)

Bildungsgang

1968-1972 Primarschule Teufenthal und Unterkulm

1972-1975 Sekundarschule Unterkulm

1975-1979 kaufm. Ausbildung

1990-1993 SfG, Basel

1993-1997 Maturitätschule f. Erwachsene, Aarau

Maturität Typ D

1998-2003 Studium der Veterinärmedizin an der

Universität Zürich

November 2003 Staatsexamen der Veterinärmedizin, Universität Zürich

Beruflicher Werdegang

1979-1990 kaufm. Berufstätigkeit

1993-1998 kaufm. Berufstätigkeit

2004-2005 Doktorandin an der Pferdeklinik der Vetsuisse-Fakultät der
Universität Zürich, Abteilung MSRU, unter der Leitung von
Frau PD Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg